

Aus dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit

der Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Rheumaorthopädie der  
Elisabeth-Klinik Bigge / Olsberg  
Ärztlicher Direktor und Geschäftsführer Prof. Dr. Dr. Axel Wilke

und

der Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik des  
Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. David Jones

# **Allogene und Xenogene Knochentransplantate – Induktion einer proinflammatorischen Reaktion in vitro?**

Inauguraldissertation zur Erlangung eines Doktorgrades der gesamten  
Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps – Universität Marburg vorgelegt von

**Sabrina Reichel**

aus Gießen

Marburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
23.07.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Dr. Axel Wilke

1. Korreferent: PD. Dr. M. Ritter

Diese Arbeit ist  
meinen Eltern und meiner Schwester  
gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 Autologe Knochentransplantation.....	10
1. 2 Allogene/homologe Knochentransplantation .....	10
1.3 Xenogene Knochentransplantation .....	11
1.4 Synthetisch hergestellte Stoffe.....	11
1.5 Integration des Knochentransplantates .....	11
1.6 Studienplanung und Fragestellung .....	13
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Versuchsaufbau .....	15
2.2 Herstellung der Knochenproben.....	19
2.2.1 Mechanische Bearbeitung.....	19
2.2.2 Sterilisation der Knochenplättchen .....	20
2.3 Knochenmarkspräparation.....	24
2.3.1 Patienten .....	24
2.3.2 IMDM-Medium.....	25
2.4 Untersuchung der Proben .....	26
2.4.1 Zellzahlbestimmung mit dem Casy®-System.....	26
2.4.2 pH-Messung.....	27
2.4.3 Enzymbestimmung.....	27
2.4.4 Zytokinbestimmung .....	28
2.5 Rasterelektronenmikroskopie .....	30
2.6 Trypanblaufärbung.....	32
2.7 Statistik .....	33

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Lichtmikroskopie</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Trypanblaufärbung</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Rasterelektronenmikroskopie</b>	<b>39</b>
<b>3.4 pH-Werte</b>	<b>42</b>
<b>3.5 Zytokinausschüttung</b>	<b>44</b>
3.5.1 IL-6-Ausschüttung	44
3.5.2 TNF-alpha-Ausschüttung	48
3.5.3 IL-1beta Ausschüttung	52
3.5.4 IFN-gamma-Ausschüttung	56
<b>3.6 Laktatdehydrogenase</b>	<b>60</b>
<b>3.7 Alkalische-Phosphatase-Produktion</b>	<b>64</b>
<b>3.8 Laktat -Produktion</b>	<b>68</b>
<b>4 Diskussion</b>	<b>72</b>
<b>4.1 Diskussion der Methode - Knochenmarkszellkultur</b>	<b>72</b>
<b>4.2 Diskussion der Sterilisationsverfahren</b>	<b>75</b>
4.2.1 Peressigsäure-Ethanol-Verfahren	75
4.2.2 Tutoplast®-Sterilisationsverfahren	77
<b>4.3 Diskussion der Parameter</b>	<b>81</b>
4.3.1 IL-6	81
4.3.2 TNF-alpha	83
4.3.3 IL-1 $\beta$	85
4.3.4 IFN- $\gamma$	86
4.3.5 Lactat und pH	88
4.3.6 Laktatdehydrogenase	92
4.3.7 Alkalische Phosphatase	93
4.3.8 Zellzahl	95
<b>4.4 Zusammenfassende Beurteilung</b>	<b>97</b>

<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>7 Literatur.....</b>	<b>102</b>
<b>8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>8.1 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>8.2 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>118</b>
<b>9 Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>120</b>
<b>10 Anhang.....</b>	<b>121</b>
<b>10.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>121</b>
10.1.1 Geräte .....	121
10.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	123
<b>10.2 Verzeichnis akademischer Lehrer .....</b>	<b>127</b>
<b>10.3 Lebenslauf .....</b>	<b>128</b>
<b>11 Danksagung.....</b>	<b>129</b>

## 1 Einleitung

Zur Defektdeckung bei Knochenläsionen und als Knochenaufbaumaterial werden Knochentransplantate/-implantate verwendet. Vor allem im Rahmen verzögerter und ausbleibender Knochenheilung bei Frakturen, Osteotomien, Endoprothetik, Pseudarthrosen, Zysten und Tumoren sowie in der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie wird dieses Verfahren genutzt. Zusätzlich findet es Anwendung bei der Ausfüllung von Knochenhöhlen- und -lücken.

Dafür werden autologe Knochentransplantate favorisiert, eine Alternative bieten allogene und xenogene Transplantate oder synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien [Vilmar et al. 1996].

An alle diese Transplantate müssen verschiedene Anforderungen gestellt werden, die im Idealfall erfüllt sein sollten. Nach Garrel und Gotzen umfassen diese unter anderem eine ausbleibende immunologische Abstoßungsreaktion. Des Weiteren sollte das Transplantat frei von mutagenen und toxischen Stoffen sein. Die Gewährleistung der Sterilität sowie der Erhalt osteogenetischer, osteoinduktiver und osteokonduktiver Eigenschaften sind ebenso zwingend erforderlich. Weitere Ideale sind Festigkeit, keine Mengen- und Lagerungsprobleme, einfache Bearbeitbarkeit und freie Auswahl in Form und Größe sowie niedrige Kosten. Jedoch gibt es kein Ersatzmaterial, das zurzeit verwendet wird, das diese Kriterien vollständig erfüllt [von Garrel et al. 1998].

Zur Verfügung stehen hierbei sowohl autologe, allogene, xenogene/ heterologe als auch synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien.

### Geschichtlicher Hintergrund

Knochentransplantationen lassen sich in der Literatur bis ins 17. Jahrhundert zurückverfolgen. Während damals die Art und Weise der Durchführung zu Schwierigkeiten führte, stellte in den letzten 30 Jahren die Sicherheit bei der Knochentransplantation das größte Problem dar.

1981 gab es erste Berichte über AIDS [Centers for Disease Control 1981]. Gleichzeitig entdeckte man dessen Übertragungsweg, womit eine potenzielle HIV-Infektion durch Knochentransplantate möglich war. Der erste berichtete Fall einer HIV-1 Übertragung durch Knochen ist im Jahr 1984 zu verzeichnen [Centers for Disease Control 1988]. Zum Zeitpunkt der Übertragung existierten keine Bluttests zum Screening für Gewebespenden. Als kurze Zeit nach diesem Vorfall ein Test verfügbar war, glaubten viele Gewebebanken, dass ein Wiederholungsfall unmöglich sei. 1985 trat erneut eine HIV-1-Übertragung auf, wahrscheinlich hatte sich der Spender damals kurz zuvor infiziert. Zusätzlich wurden in dieser Zeit noch zwei Fälle von Hepatitis-C-Übertragung bekannt [Eggen et al. 1992]. Ein Fall trat vor der Verfügbarkeit eines Tests für HCV auf, der andere ereignete sich trotz eines sensitiven, aber Erst-Generation Bluttests auf diese Viren.

Als Folge dieser zwei Fälle der Krankheitsübertragung, war die Sicherheit bei Knochentransplantaten, vor deren Verfügbarkeit, das größere Problem. Sowohl Anbieter und Verbraucher, als auch die Bundesbehörde, waren aufgrund der Krankheitsübertragungen beunruhigt. Das vermehrte Wissen über die Übertragungen führte zu Untersuchungen, Methoden zum Spender-Screening wurden geändert, neue Methoden zur Behandlung und Bearbeitung der Knochen wurden entwickelt.

Im Anschluss an den ersten Fall der AIDS-Übertragung, veröffentlichte 1987 das Centers for Disease Control (CDC) Richtlinien für die Spender-Testung, die sich vor allem auf Femurkopf-Spender bezogen. Darin wurde eine weitere Testung des Lebendspenders nach sechs Monaten verlangt. Leichenspenden hingegen konnten nicht noch einmal getestet werden. So entwickelte das CDC detaillierte Richtlinien zu deren Überprüfung.

Alle diese Knochentransplantate, die den HI-Virus übertrugen, enthielten Blut und Knochenmark, da sie unbehandelt waren. Dies zeigte die Notwendigkeit Knochentransplantate von Blut und Knochenmark zu befreien, um das Risiko der Krankheitsübertragung zu reduzieren.

Die Gewebebanken entwickelten neue Methoden für die Aufbereitung und Behandlung von Knochentransplantaten, um die Sicherheit zu steigern. Einige



Banken etablierten patentrechtlich geschützte Knochenwaschungen, die zu einer Viruselimination an jeder Knochenoberfläche führten. Es wurden neue Erschließungen in Reinraumtechnologie übernommen sowie strengere Umgebungskontrollen der Bereiche, in denen Gewebe präpariert wird, eingeführt. Da die serologische Bluttestung der Spender abhängig von der Zuverlässigkeit und der Genauigkeit der Tests ist, wurden zuverlässigere Bluttests von den Gewebebanken übernommen.

In den letzten 15 Jahren wurden mehr als eine Million Knochen transplantiert, ohne Nachweis von AIDS oder Hepatitis Übertragungen. In den USA gab es seit dem letzten AIDS-Fall 1985 [Simonds et al. 1992] keine weiteren Infektionen bei Knochentransplantationen. Dies beweist, dass die Gewebebanken die Spender erfolgreich testen und die Transplantate gut aufbereiten.

Die Zahl der autologen Knochentransplantationen in Deutschland beträgt jährlich 75.000, die der allogenen 30.000 [Europäisches Parlament und Rat 2005]. In Berlin (Gewebebank am Institut für Transfusionsmedizin der Charité) und Leipzig (Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz) gibt es die momentan einzigen überregionalen Gewebebanken, die kortikospongiöse Knochentransplantate und muskuloskelettale Transplantate bereithalten. 400 klinikinterne oder lokale Knochenbanken findet man an unfallchirurgischen bzw. orthopädischen Kliniken. Diese beinhalten vor allem Femurköpfe, die bei Totalendoprothesen-Operationen des Hüftgelenkes steril entnommen werden. Danach erfolgt deren Konservierung bei mindestens -70°C. Durch Gefriertrocknung kann man Lagerzeiten von bis zu 5 Jahren erzielen. [Tomford 2000]

## **1.1 Autologe Knochentransplantation**

Autologe Transplantate werden als Goldstandard angesehen. Sie haben osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften und können somit schnell und sicher einheilen [Rössler Rüther Steinhagen 2005].

Somit stellt die frische, autologe Spongiosa das ideale Material zur Knochentransplantation dar, welches ein gutes Einwachsen des neuen Knochens ermöglicht. Die Entnahme erfolgt am häufigsten aus dem Beckenkamm, zusätzlich auch aus Fibula, Tibiakopf, Rippen, Schädelkalotte oder Schulterblatt. Daneben wird in der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie Knochengewebe aus der intraoralen Region verwendet. Der Nachteil hierbei liegt darin, dass nur kleine und mittelgroße Späne entnommen werden können [Debrunner 2000]. Weitere Komplikationen, besonders bei Entnahme aus dem Beckenkamm, sind Wunddehiszenz, Gefäßverletzung, Hämatom, Nervenverletzung, Frakturen sowie Schmerzen [Goulet et al. 1997; Jäger et al. 2005]

## **1. 2 Allogene/homologe Knochentransplantation**

Allogene Knochentransplantate stammen von einem menschlichen Spender. Es handelt sich meist um Femurköpfe, die im Rahmen von Endoprothesenoperationen gewonnen werden.

Durch verschiedene Prozesse, wie dem Peressigsäure-Ethanol-Verfahren, der Gamma-Bestrahlung, Autoklavierung und weiteren Verfahren soll die Sterilität für den Empfänger gewährleistet werden. Dabei sollen die biomechanischen Eigenschaften des Transplantates erhalten bleiben. [Friedlaender 1983; De Long et al. 2007].

### **1.3 Xenogene Knochentransplantation**

Xenogene Transplantate stammen von einer anderen Spezies, wie etwa Rindern oder Schweinen. Es handelt sich hierbei meist um kommerziell erhältliche Materialien. Hierzu zählt Tutobone®.

### **1.4 Synthetisch hergestellte Stoffe**

Synthetisch hergestellte Materialien basieren auf einer Calcium-/Phosphatgrundlage. Sie sind auf dem Markt erhältlich, zum Beispiel als Calcibon® und Endobon®.

### **1.5 Integration des Knochentransplantates**

Das Knochentransplantat soll idealerweise rasch in den verletzten Knochen integriert und eingebaut werden, um anschließend die Funktion des betroffenen Skeletts zu übernehmen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Osteoinduktion, wobei das Transplantat in der Lage ist, nichtdifferenzierte Stamm- und Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten umzuwandeln. In dessen Folge wird rasch neuer Knochen gebildet [Urist et al. 1967; Boyce et al. 1999]. Voraussetzung dafür sind noch im Transplantat enthaltene Zellen, zelluläre Bestandteile und Botenstoffe. Zu letzterem zählt das bone morphogenetic protein (BMP), welches hierbei von besonderer Bedeutung ist [Reddi 1998; Albrektsson et al. 2001].

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Osteokonduktion um die Fähigkeit des Transplantates, durch gewisse Eigenschaften, das Einwandern sowie die Bindung von Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und anderer osteogenen Zellen zu fördern [Boyce et al. 1999].

Osteoinduktion und Osteokonduktion findet sich allein bei autologen Transplantaten, wodurch die Integration am schnellsten erreicht wird.

Bei unbehandelten allogenen Transplantaten kommt es nach Implantation nicht zu einer Osteoinduktion, da der Empfänger das Material als fremd erkennt und durch seine Immunabwehr die enthaltenen Zellen im Transplantat zerstört.

Somit kommt es zu einer Abstoßungsreaktion, wodurch auch das umliegende Gewebe geschädigt werden kann [Galea et al. 2005].

Da eine Transplantation von unbehandeltem, allogenen Material dementsprechend nicht möglich ist, erfolgt die Verarbeitung im Rahmen der Richtlinien der Bundesärztekammer zum Führen einer Knochenbank [Bundesärztekammer 2001].

Was allerdings mit behandelten allogenen, xenogenen bzw. synthetisch hergestellten Knochentransplantaten erfolgt, ist in der aktuellen Literatur nicht abschließend geklärt. Daher soll im Rahmen dieser Studie die Frage geklärt werden, ob Peressigsäure-Ethanol bei allogenen Transplantaten bzw. Tutobone® bei xenogenem Material in vitro ebenso eine proinflammatorische Reaktion wie unbehandelte Knochentransplantate hervorrufen.

## 1.6 Studienplanung und Fragestellung

Allogene Knochentransplantate benötigen kliniksinterne Knochenbanken. Das Betreiben dieser Banken ist mit einem hohen organisatorischen und zeitaufwendigen Prozess verbunden. Außerdem sind die Transplantate quantitativ begrenzt.

Eine Alternative stellen unter anderem bovine Transplantate dar. Diese werden extern in speziellen Firmen hergestellt und sind kommerziell erhältlich. Eine derartige Firma ist die Tutogen Medical GmbH. Sie vertreibt vor allem bovine Knochenmaterialien.

Während früher die Sterilität der Transplantate im Vordergrund stand, spielen heute eher Faktoren wie Osteoinduktivität und Osteokonduktivität eine Rolle. Diese werden durch Sterilisation und Konservierung negativ beeinflusst.

In der Vergangenheit finden sich zahlreiche Studien, die Knochentransplantate humanen und bovinen Ursprungs untersucht haben. Dabei lag der Schwerpunkt meist auf den biomechanischen Eigenschaften der Knochentransplantate. Hofmann et al. untersuchten die Festigkeit von Pins aus boviner Tibiakompakta, die nach verschiedenen Methoden sterilisiert wurden, darunter auch das Tutoplast®-Verfahren. Dieses lieferte bezüglich der Fragestellung die besten mechanischen Ergebnisse im Belastungstest [Berns et al. 2001].

Weitere Studien basierten auf Osteoblastenzellkulturen. Sie betrachteten die Auswirkung von Knochentransplantaten in Hinblick auf die Osteoblastenproliferation bei unterschiedlich behandelten Knochentransplantaten. Dort wurden osteoblastenspezifische Marker wie Alkalische Phosphatase und Osteokalcin untersucht [Mejdahl et al. 1998; Hofmann et al. 2000].

In den letzten Jahren wurde der Begriff der Osteoimmunologie immer bedeutender. Hierbei stehen Immunsystem und Knochenstoffwechsel in enger Wechselwirkung miteinander.

Hierzu existieren nur wenige Studien. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Interaktion von Knochen und Immunsystem, im Hinblick auf die proinflammatorischen Reaktion unterschiedlich sterilisierter Knochen-

transplantate. Dabei spielen Zytokine eine zentrale Rolle. Die Förderung der Osteoklastogenese übernehmen IL-1-alpha und -beta, IL-6 und TNF-alpha [Kudo et al. 2002]. Im Gegensatz dazu hemmen IFN-gamma und weitere Zytokine die Osteoklastenaktivität [Roodman 1999].

In der Regel wurden in der Vergangenheit primär reine Osteoblastenzellkulturen untersucht. Diese Studie verwendet jedoch eine Knochenmarkszellkultur wie sie von Kalla [Kalla et al. 1991] entwickelt, von Wilke modifiziert und in Biokompatibilitätstestungen angewendet wurde [Wilke et al. 1995; Wilke et al. 1998]. Dies ermöglicht nahe in vivo-Bedingungen, da die Knochentransplantate nach Implantation in direktem Kontakt mit den Stammzellen des Knochenmarks stehen.

Die Frage, ob bovine Knochenmaterialien die gleichen Eigenschaften wie humane Knochentransplantate, in Bezug auf proinflammatorische Reaktionen durch Zytokine, aufweisen und somit eine Alternative zu humanem Material darstellen, soll in dieser Studie betrachtet werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsaufbau**

In dieser Studie wurden zwei Sterilisationsverfahren für Knochentransplantate über einen Zeitraum von 12 Wochen miteinander verglichen. Zum einen handelte es sich dabei um humane Knochenplättchen, die nach dem Peressigsäure/Ethanol-Verfahren sterilisiert wurden. Die Vergleichsgruppe bestand aus bovinen Knochenplättchen, die mit dem Tutoplast®-Verfahren (Tutobone®) behandelt wurden.

Hierfür wurden kreisförmige 1er Wells mit einer Fläche von  $9,62 \text{ cm}^2$  verwendet. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg liegt für diese Studie vor: AZ 66/03.

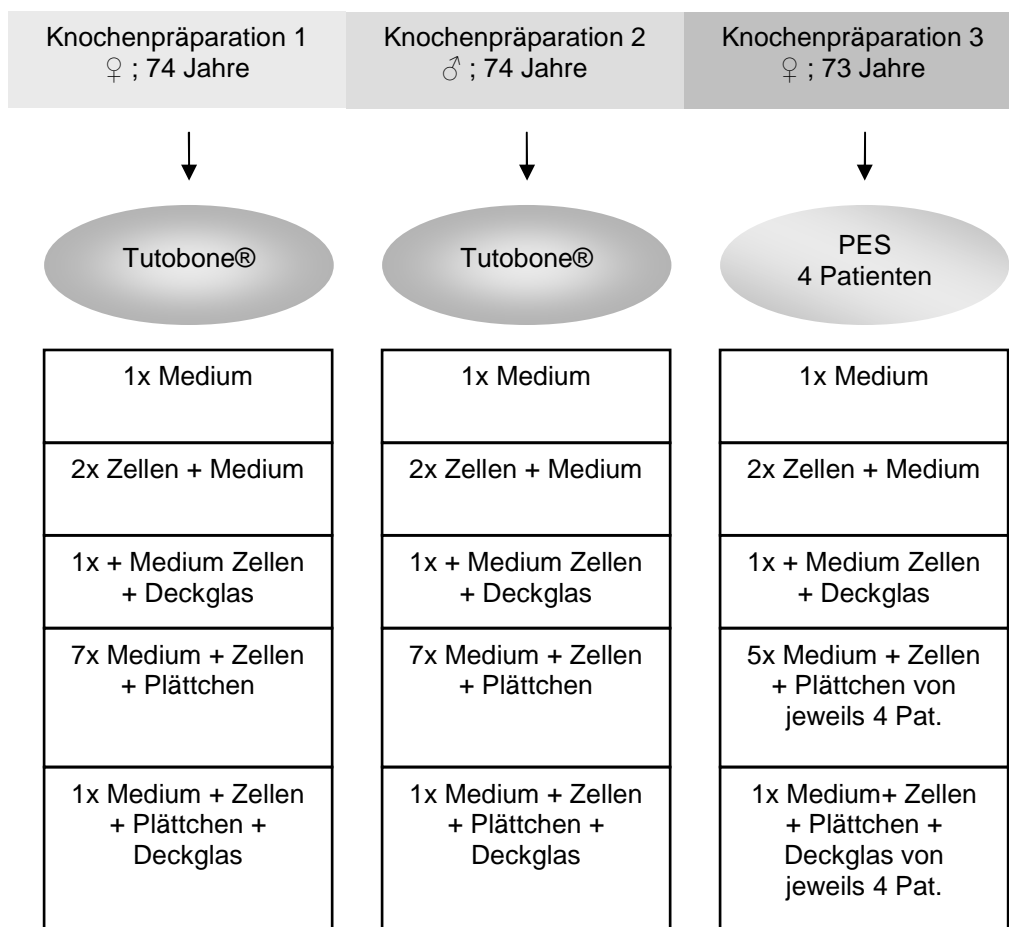


Abbildung 1: Schematischer Versuchsaufbau

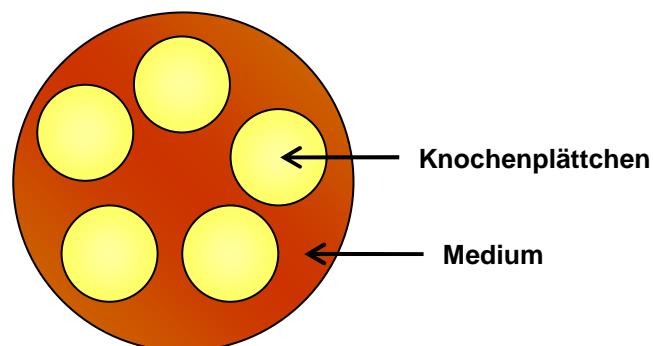


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines 1er well mit Knochenplättchen

Die nach dem Peressigsäure-Verfahren sterilisierte Knochenplättchen stammten von vier Patienten (2 Männer, 2 Frauen) im Alter von 65 bis 75 Jahren. Pro Patient gab es sechs Wells mit je 5 Knochenplättchen (siehe



Abbildung 2), so dass insgesamt 24 Wells mit Proben vorlagen, die mit dem PES-Verfahren behandelt wurden. Auf diese Knochenproben wurden 3,5 ml Knochenmarkszellsuspension mit insgesamt 3 Millionen Zellen gegeben. Zusätzlich gab es ein Well nur mit Medium und 3 Wells, in denen sich nur die Zellsuspension befand.

Für das Tutoplast®-Verfahren mit bovinen Knochen wurden zweimal 8 Wells mit je 5 Knochenplättchen mit Zellsuspensionen, die von zwei unterschiedlichen Patienten stammten, bedeckt. Zusätzlich inkubierte man zum Vergleich nur Zellen und nur Medium.

Bei jedem Versuchsansatz wurde jeweils ein Well, das Knochenplättchen enthielt, zusätzlich mit einem Deckgläschen für spätere Rasterelektronenmikroskopie versehen. Auch jeweils ein Well, das nur Zellen beinhaltete, wurde mit einem Deckglas versehen (siehe Abbildung 1).

Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Anschließend wurden die Zellen für 12 Wochen in einem Wärmeschrank mit 37°C, 12,5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 0% N<sub>2</sub> inkubiert.

1 ml Wachstumsfaktor von IL-3 und GM-CSF wurde bei jedem Wechsel auf 40 ml Medium zugegeben. Diese Wachstumsfaktoren dienten zur Stimulation der Zellkultur und wurden in der Konzentration 10 ng/ml (das entspricht 1ml Wachstumsfaktor für 40 ml Medium) verwendet [Kalla et al. 1991; Griss et al. 1993; Wilke et al. 1993; Wilke 1995; Wilke et al. 1995; Wilke et al. 1998].

Bei jedem Wechsel wurden 3 ml Medium entnommen und diese dann in einem Falcon Tube gesammelt. Nach Zentrifugation bei 2200 U und 10°C für 10 Minuten, bei der sich die abgenommenen Zellen auf dem Boden absetzten, erfolgte die Messung der pH-Werte. Danach wurden 2 ml des Mediumüberstandes in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und bei -80°C eingefroren. Das Zellpallet wurde wieder in dem restlichen Milliliter resuspendiert. Danach erfolgte daraus die Zellzahlbestimmung der abgenommenen Zellen mit dem Casy-Gerät. Dieses diente der eigenen Kontrolle, um sicher zu stellen, dass in jeder Gruppe nicht unterschiedlich viele

Zellen abgenommen wurden. Das Procedere wurde über 4 Wochen alle 48 Stunden durchgeführt. Nach dieser Zeit erfolgten die gesamten Schritte nur noch bei jedem vierten Mediumwechsel. Ein Mediumwechsel fand weiterhin alle 48 Stunden statt, wobei das abgenommene Medium verworfen wurde.

Bei jedem Mediumwechsel wurde das Wachstumsverhalten der Zellkultur lichtmikroskopisch beurteilt.

## **2.2 Herstellung der Knochenproben**

### **2.2.1 Mechanische Bearbeitung**

Zur Herstellung der zylinderförmigen Knochenplättchen mit 10 mm Durchmesser und 3 mm Höhe wurden Hüftköpfe verwendet die im Rahmen der totalen Hüftkopfundoprothesenoperation entnommen wurden. Die Patienten waren im Alter von 65 bis 75 Jahren und an einer Coxarthrose erkrankt. Davon abgesehen waren sie gesund, hatten vor der Operation eine Eigenblutspende vorgenommen und waren zur Knochenspende vorgesehen, was die serologische Testung der Patienten gewährleistete. Zum Schneiden und Bohren wurden die Hüftköpfe aus der Kühltruhe (-80°C) entnommen und zu Knochenplättchen weiterverarbeitet.

Das Schneiden der Hüftköpfe erfolgte mit einer EXACT-Säge mit einem Diamant-Sägeblatt. Währenddessen wurde das Sägeblatt mit Ringerlösung bei 4°C gekühlt. Dabei entstanden Knochenscheiben mit einer Höhe von 3 mm.

Danach wurden aus diesen Knochenscheiben Knochenplättchen, mit einem Durchmesser von 10 mm, mit dem Diamantbohrer hergestellt. Dabei erfolgte wieder eine Spülung mit Ringerlösung.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Plättchen erneut bei -80°C patientenzugehörig eingefroren.

### 2.2.2 Sterilisation der Knochenplättchen

Die Sterilisation der humanen Knochenplättchen mit dem PES-Verfahren wurde in der Gewebebank des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité in Berlin durchgeführt. Die Knochen wurden gekühlt nach Berlin transportiert wo die Weiterbehandlung erfolgte. Nach der Sterilisation wurden die Plättchen steril verpackt wieder zurück gesendet.

Die mechanische Herstellung der Rinderknochenplättchen und die anschließende Sterilisation nach dem Tutoplast®-Verfahren wurde bei der Firma Tutogen in Neunkirchen am Brand durchgeführt. Die Größe der Plättchen war identisch mit den eigens hergestellten, humanen Knochenplättchen.

#### ***Das Peressigsäure-Ethanol-Sterilisationsverfahren***

Peressigsäure ist ein Desinfektionsmittel, welches schnell ein großes Spektrum an Bakterien, Pilzen und Viren inaktivieren kann [Kline et al. 1960; Sproessig et al. 1965; Werner et al. 1973; Sprössig 1979]. Außerdem zerstört Peressigsäure nicht die Knochenstruktur und -beschaffenheit. Der Sterilisationseffekt scheint auf dem Mechanismus der schnellen Penetration in die Mikroorganismen zu beruhen. Zusätzlich werden Sauerstoff und freie Radikale freigegeben, die für die Oxidation und Zerstörung der Mikroorganismen verantwortlich sind [Sporkenbach et al. 1981]. Spössig und Mücke zeigten zudem, dass Alkohol den Effekt der Elimination von Mikroorganismen erhöht [Sproessig et al. 1965].

Die Knochen wurden zunächst mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch behandelt. Dies diente zur Entfernung der Fettschranken.

Das PES-Molekül ist sehr gut lipidlöslich und kann alle Zellmembranen durchdringen. Peressigsäure-Ethanol besteht aus einem Gemisch von 2 Volumenanteilen Peressigsäure auf 20 g/l H<sub>2</sub>O, 1 Volumenteil 96%-igem Ethanol und einem Volumenanteil sterilen H<sub>2</sub>O.

Diese Moleküle gelangen zu den ungeschützten, oxidationsempfindlichen Stoffwechsellenzymen und spalten den aktiven Sauerstoff ab. Es werden vor allem Elemente mit SH- oder S-S-Gruppen oxidiert. Dadurch verlieren sie irreversibel ihre Funktion und der Zellstoffwechsel bricht zusammen.

Durch Einsatz des Ethanols, wird die Oberflächenspannung herabgesetzt und durch den Unterdruck (200 mbar) werden die in der Peressigsäurereaktion entstehenden Gasbläschen entfernt.

Das Gemisch wurde vier Stunden bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Danach erfolgte die mehrfache Spülung mit Soerensen Puffer, der aus einer physiologischen Natriumcarbonatchloridlösung besteht. Schließlich wurden sie gefriergetrocknet und unter sterilen Bedingungen zweifach verpackt [Pruss et al. 1999; Pruss et al. 2001].

In einer klinischen Studie zeigte sich, dass bis zu fünf Jahren nach Transplantation von allogenen Gewebe wie Knochen, Bändern, Faszien, Haut und Sehnen, die nach dem PES Verfahren sterilisiert wurden, es gute bis sehr gute Resultate gibt. Pruss et al. zeigten, dass in allen Gebieten weniger als 1% sekundäre Wundheilung oder Revisionsoperationen erfolgten. Damit konnte ein guter klinischer Effekt ohne relevante Nebenwirkungen, wie Infektion oder Abstoßungsreaktion, gezeigt werden [Pruss et al. 2002].

### ***Das Tutoplast®-Verfahren***

Das Tutoplast®-Konservierungsverfahren wird seit über 30 Jahren zur Sterilisation von Knochenaufbaumaterialien biologischen Ursprungs verwendet. Die Firma Tutogen Medical GmbH ist ein pharmazeutisch, medizintechnisches Unternehmen mit Sitz in Neunkirchen am Brand. Dort werden verschiedene Produkte hergestellt. Dazu zählt das in dieser Studie verwendete, Tutobone®, Tutoplast®-Spongiosa, Totodent® für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie und Kollagenmembranen für Gewebeersatz. Ein speziell patentiertes Verfahren wird für den Sterilisationsprozess verwendet.

Das Unternehmen liefert sowohl allogene als auch xenogene Transplantate.

Der Tutoplast®-Prozess wurde in zahlreichen Studien getestet. An der Universität Erlangen zeigte man, dass HI- und Hepatitis-Viren abgetötet werden. Im Institut Pasteur Texcel in Paris demonstrierte man, dass der Tutoplast®-Prozess sämtliche Viren inaktiviert [Akira et al. 1993].

Des Weiteren ist der Tutoplast®-Prozess durch die World Health Organization als Klasse IV eingestuft worden, dies gewährleistet keine Infektiosität.

In einer Studie aus Italien von Conto konnte eine Prioninaktivierung gezeigt werden [Conto 1994].

Das Verfahren wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Der gesamte Prozess umfasste 5 Arbeitsschritte.

- (1) Zuerst erfolgte die Entfettung des Knochengewebes durch eine Aceton-Spülung im Ultraschallbad. Dabei wurden Viren und Prione inaktiviert und eliminiert. Das Entfernen der Lipide ist wichtig, da sie sonst den Heilungsprozess stören, Bakterienwachstum fördern und nach Bestrahlung zytotoxisch wirken können.
- (2) Danach wurde die osmotische Behandlung in Wechselbädern mit destilliertem Wasser und Salzlösung durchgeführt. Dabei wurden die Zellwände aufgebrochen, die Antigenität eliminiert und die Bakterien inaktiviert.
- (3) Der nächste Schritt des Tutoplast®-Prozesses umfasste die Wasserstoffperoxid-Spülung als oxidative Behandlung. Diese zerstört die Proteine und entfernt die Restantigenität. Auch dieser Schritt dient der Inaktivierung und Eliminierung von Viren und Prionen.
- (4) Nach der oxidativen Behandlung folgte die Dehydration durch Aceton-Spülung. Dies entzieht dem Gewebe das Wasser und macht es fünf Jahre lagerfähig. Dabei wurde der natürliche Verbund aus Kollagen und Mineral erhalten. Zusätzlich wurden Viren und Prione inaktiviert

- (5) Im letzten Schritt erfolgten die Endverpackung und Sterilisation. Das Xenograft wurde doppelt steril verpackt und mit validierter Gamma-Sterilisation bei 17,8 kGy (max. 20,5 kGy) bestrahlt. Dies gewährleistet Sterilität nach amerikanischem (AAMI) und europäischem (EN 522) Standard [Tutogen].

## 2.3 Knochenmarkspräparation

Kalla und Mitarbeiter zeigten 1991, dass bei der Isolation von humanen Knochenmarkzellen im Rahmen einer Sternalpunktaspiration und einem bei einer totalen Hüftgelenksendoprothesenoperation gewonnenen Spongiosablockes Unterschiede bestehen. Beide beinhalten die Zellpopulationszusammensetzung von humanem Knochenmark. Jedoch konnten Kalla und Mitarbeiter zeigen, dass die absolute Zellzahl bei der Sternalpunktion immer geringer ist als im Vergleich zur absoluten Zellzahl beim Spongiosablock [Kalla et al. 1991].

### 2.3.1 Patienten

Das Patientengut umfasste drei gesunde Patienten (2 Frauen und einen Mann) im Alter von 73 und 74 Jahren, die an einer Cocksarthrose erkrankt waren. Die Patienten waren serologisch getestet, da sie zuvor eine Eigenblutspende durchgeführt und einer Knochenspende zugestimmt hatten.

Knochenmark wurde im Rahmen der totalen Hüftgelenksendoprothese (TEP) aus dem proximalen Femurschaft steril entnommen. Es handelte sich dabei um einen spongiösen markhaltigen Block.

Es folgte die Weiterverarbeitung unter einem Lamina-Airflow.

Der Spongiosablock wurde zunächst in einer Petrischale nach Zugabe von PBS mechanisch mit einer Zange zerkleinert. Danach wurde die Suspension durch einen Sieb mit der Porengröße von 0,1 mm gegeben, um Spongiosareste von der Suspension zu trennen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis 160 ml Zellsuspension vorhanden waren.

Anschließend wurde ein Gradientengemisch aus Histopaque und Biocoll im Verhältnis 1:2 hergestellt und davon je 4 ml in 20 Zentrifugenröhrchen (Volumen 20 ml) gegeben. Auf dieses Gemisch pipettierte man 8 ml der Zellsuspension, so dass eine scharfe Grenze zwischen beiden Phasen sichtbar wurde.



Danach wurden die Röhrchen für 20 Minuten bei 2200 U/min und 10 °C zentrifugiert.

Die dabei entstandene weiße Zellreihe wurde zunächst abpipettiert, der Inhalt von 5 kleinen Röhrchen in ein großes 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und dann auf 50 ml mit PBS aufgefüllt.

Es folgte eine weitere Zentrifugation der großen Röhrchen für 10 Minuten bei 2200 U/min und 20°C. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Röhrchen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 2200 U/min und 20°C wurde der Überstand nochmals abgesaugt, auf 50 ml mit Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mittels Casy-System die Zellzahl bestimmt und dementsprechend die Suspension angeglichen, so dass pro well 3 Mio. Zellen enthalten waren.

### 2.3.2 IMDM-Medium

IMDM = ISCOVE's modified Dulbecco's Medium [Kalla et al. 1991]

Die Herstellung des Mediums erfolgte immer nach diesem Rezept.

Für 500 ml Medium:

- 0,5 ml Certomycin
- 30 ml NaHCO<sub>3</sub> Lösung (= 1,5 g)
- 8,85 g ISCOVE's
- 65 ml Horse Serum
- 65 ml FKS (fetales Kälberserum)
- 0,5 ml Hydrocortison einer 5mM Stammlösung
- ad Aqua dest

Nach Zugabe der Zutaten wurde das Medium mit einem Magnetrührer gemischt. Danach wurde es steril unter der Lamina-Airflow gefiltert.

## 2.4 Untersuchung der Proben

### 2.4.1 Zellzahlbestimmung mit dem Casy®-System

Während des Beobachtungszeitraumes erfolgte in den ersten 4 Wochen alle 48 Stunden, danach einmal pro Woche eine Zellzahlbestimmung aus dem abgenommenen Medium. Diese Messung wurde aus jeder Probe vorgenommen.

Genaue Zellzahlbestimmungen während des gesamten Versuchszeitraumes und zu Beginn wurden durch den CASY®-Zähler gewährleistet. Die Größe der vitalen Zellen lag zwischen 6,25 bis 40,0  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 3).

Nach Zentrifugation der, bei dem Mediumwechsel abgenommenen 3 ml bei 10°C mit 2200 U/min für 10 Minuten, wurden 2 ml Mediumüberstand abgenommen und eingefroren. Die Zellzählung erfolgte aus dem verbleibenden 1 ml. Am Boden des Falcon Tubes hatten sich nach Zentrifugation die Zellen abgesetzt, dieses Pallet wurde mit 1 ml PBS resuspendiert und daraus die Zellzahl bestimmt. Dies erfolgte mit dem Casy®-Gerät.

Von dieser Zellsuspension wurden 10  $\mu\text{l}$  in ein Gefäß mit 10 ml isotoner Flüssigkeit (CASYton®) zur Zellzahlbestimmung gegeben. Man erhielt die Zellzahl, die in einem Milliliter vorhanden war.

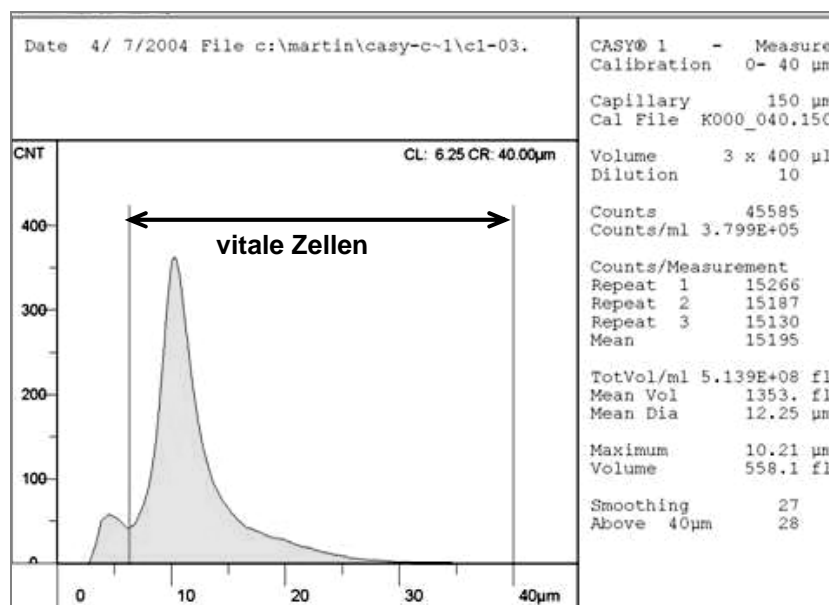


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der Anzahl an vitalen Zellen

### 2.4.2 pH-Messung

Die pH-Bestimmung erfolgte in den ersten vier Wochen bei jedem Mediumwechsel und jeder Probe. Danach wurden die Messungen nur noch bei jedem vierten Mediumwechsel durchgeführt.

Nach Kalibrierung der Elektrode des pH-Meters und der anschließenden Spülung mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Messung der Proben bei Raumtemperatur.

### 2.4.3 Enzymbestimmung

#### **Alkalische-Phosphatase-, Laktat- und Laktatdehydrogenase - Bestimmung**

Alle Messungen wurden vom Zentrallabor der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Die Alkalische-Phosphatase-Messung wurde bei 37° C durchgeführt. Durch eine enzymatische Reaktion entstand ein gelber Farbstoff dessen Extinktionszunahme bei 410 nm gemessen wurde.

Die Laktatmessung erfolgte bei 37° C. Bei der Oxidation von Laktat zu Pyruvat entstand Wasserstoffperoxid. Dieses reagierte mit einer Peroxidase zu einem Farbstoff, dessen Intensität proportional zur Laktatkonzentration war und photometrisch bei 520 nm gemessen wurde.

Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase erfolgte photometrisch. Dabei wurde die Extinktionszunahme bei 340 nm im Reaktionsgemisch bestimmt.

#### 2.4.4 Zytokinbestimmung

##### **ELISA**

Der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ist ein Immunoassay. Damit lässt sich die Antigenkonzentration mittels Substratumsatz bestimmen.

Es wurden 96er Well Platten mit den entsprechenden Antikörpern für IL-6, TNF-alpha, IL-1 $\beta$  oder IFN- $\gamma$  beschichtet.

Der erste Schritt beinhaltete das Coaten. Dazu erfolgte eine Mischung aus Capture-Antibody mit Coating-Buffer im Verhältnis 1:250. Je 100 $\mu$ l davon pipettierte man in ein Well. Diese wurden 18 bis 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt.

Nach 24 Stunden wurde der Flüssigkeitsüberstand in der Platte entfernt und trocken geklopft. Danach erfolgte das dreimalige Waschen mit 300  $\mu$ l Waschpuffer.

Nach Zugabe von 200 $\mu$ l Assay-Diluent in jedes Well und einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden erneut drei Waschgänge mit Assay-Diluent durchgeführt.

Es folgten das Auftragen der Standard-Verdünnungen und der Proben sowie ein Leerwert mit Assay-Diluent auf die Platte mit jeweils 100  $\mu$ l. Dabei wurden jeweils Doppelbestimmungen pro Probe oder Standard-Verdünnung durchgeführt.

Der Standard wurde nach Vorschrift in einer bestimmten Konzentration, z.B. 300 pg/ml, angesetzt und dann sechsmal 1:2 verdünnt. Die Proben sind zuvor bei Raumtemperatur aufgetaut und gemischt worden.

Die Inkubationszeit nach dem Auftragen der Proben betrug zwei Stunden.

Es folgten 5 weitere Waschgänge mit Assay-Diluent. Die trockene Platte wurde dann mit 100  $\mu$ l Working-Detektor beschichtet, der sich aus Assay-Diluent, Detection-Antibody und Enzym-Substrat zusammensetzte.

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Platte siebenmal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Danach gab man Substrat-Reagent A und Substrat-Reagent B im Verhältnis 1:1 in die Wells (100 µl) und inkubierte diese für eine halbe Stunde im Dunklen.

Zum Schluss wurden 50 µl Stopp-Lösung auf die Platte gegeben. Dann erfolgte die Messung der Extinktion bei 570 nm – 450 nm im Absorptionsphotometer.

Da bei den IL-6 Messungen sehr hohe Werte, die den Messbereich überschritten, erreicht wurden, erfolgte die Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:41.

## 2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Bei einem Teil der Proben wurden die Knochenplättchen auf ein Deckglas gelegt. Zum Vergleich wurden Zellen auf ein Deckglas ohne Knochenplättchen ausgesät. Eine 0-Probe, mit nach jedem Verfahren sterilisierten Knochenplättchen, lag ebenfalls vor.

Am Ende der 12 Wochen erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Knochen und der Deckgläser.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Knochenproben für 24 Stunden mit einem 2%-igem Glutaraldehyd-Formaldehyd-Gemisch fixiert und im Kühlschrank bei 4 – 6° C aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine 6-stündige Inkubation mit 2%-iger Osmiumtetroxid-Lösung in 0,1 M Kakodylatpuffer. Danach wurden vier Waschungen mit destilliertem Wasser vorgenommen.

Die Deckgläser mit nur Zellen fixierte man mit einem Gemisch aus 11,5 ml Kakodylatpuffer, 11,5 ml Aqua dest. und 2 ml Glutaraldehyd für zwei Stunden. Nach drei Waschgängen mit 0,1 M Kakodylatpuffer wurden diese ebenfalls im Kühlschrank aufbewahrt.

Den Spülvorgängen folgte die Sekundärfixation der Knochenplättchen und der Deckgläser mit 2%-iger Osmiumtetroxid für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Es schlossen sich vier Waschgänge mit destilliertem Wasser an.

Beide Proben, Knochen und nur Deckgläser, wurden nach dem Spülvorgang mit einer aufsteigenden Acetonreihe für je 20 Minuten (50%, 70%, 80%, 90%, 90% und 100% igem Aceton) bei Raumtemperatur entwässert.

Die Trocknung beider Proben fand in der Critical Point Kammer statt. Diese ist eine Kammer, in der das Aceton vollständig gegen CO<sub>2</sub> ausgetauscht und getrocknet wird.

Die Proben wurden in die Druckkammer gegeben und Aceton eingefüllt, so dass die Proben gerade noch bedeckt waren. Nach Schließen der Druckkammer öffnete man die CO<sub>2</sub> Flasche und senkte die Temperatur mittels Vorkühlung auf 0 - 5°C.

Durch Öffnung des Einlassventils wurde CO<sub>2</sub> in die Kammer eingelassen. Nach 5 bis 15 Minuten öffnete man das Auslassventil um den Flüssigkeitsspiegel zu senken, bis die Proben gerade noch bedeckt waren. Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt, bis das Aceton vollständig ausgetauscht war. Der Kammerdruck betrug während des Vorgangs 50 bar.

Nun konnte die Heizung eingeschaltet werden. Wenn der kritische Wert für CO<sub>2</sub> mit 31,1°C / 72,9 bar erreicht war, wurde der Kammerdruck wieder vorsichtig abgesenkt und die Proben entnommen.

Schließlich bedampfte man die Proben im Sputter-Coater für 1,3 Minuten bei 1,2 kV und 40 mA mit Gold.

Danach erfolgte die mikroskopische Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop.

## 2.6 Trypanblaufärbung

Die Trypanblaufärbung erfolgte nach 12 Wochen Beobachtungszeit.

Das Medium in den Wells wurde abpipettiert, dann zweimal mit PBS gespült. und in 50 ml Falcon Tubes gesammelt.

Es folgte die Zugabe von Trypsin, so dass die Knochenplättchen noch gerade bedeckt waren. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde dann überprüft, wann sich die Zellen lösten. Nach Abnahme von Trypsin folgte die zweimalige Spülung des Wells mit PBS. Danach wurde der Vorgang nochmals wiederholt.

Anschließend folgte die Zentrifugation des gesammelten Mediums im Falcon Tube für 10 min bei 2200 U/min und bei 20° C. Das dabei entstandene Zellpallet wurde in 1ml PBS resuspendiert und in einen Eppendorf 1,5 ml Behälter gegeben und bei 1600 U/min 5 Minuten zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes, erfolgte die Zugabe von 80 µl 0,5 %-iger Trypanblaufarbe.

Die Neubauer-Zählkammer war zuvor mit Alkohol entfettet und mit einem Deckglas versehen worden. Danach schloss sich das das Auftragen des Gemisches am Rande des Deckglases und die sofortige Auszählung unter dem Mikroskop an (siehe Abbildung 4).

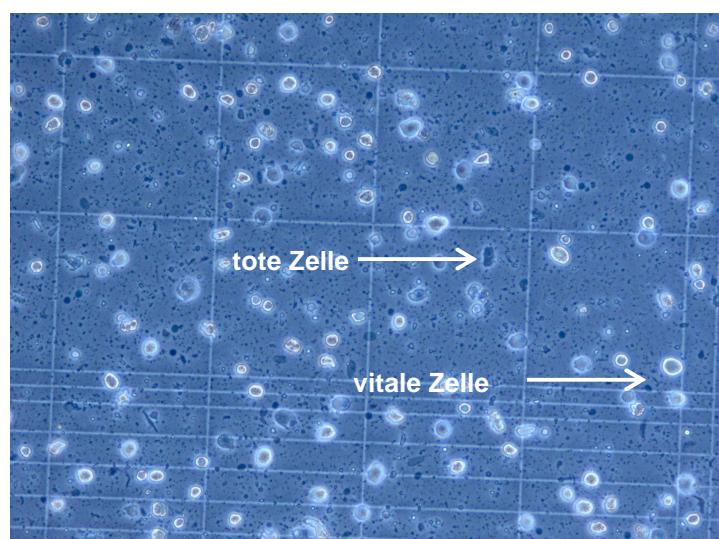


Abbildung 4: Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung



## 2.7 Statistik

Die in dieser Studie vorgenommen Messungen von Zytokinen, pH-Werten, Laktat, LDH und AP folgten einer Normalverteilung.

Eine Aussage über die Signifikanz der Werte konnte man mit dem Students-T-Test für unverbundene Stichproben erhalten. Damit lassen sich zwei Stichproben, in diesem Fall die von humanen und bovinen Knochen, miteinander vergleichen.

Das allgemeine Vorgehen dieser Untersuchung soll im Folgenden anhand eines Beispiels der Laktatausschüttung verdeutlicht werden.

Verglichen werden zwei Stichproben X und Y, deren Datensituation sich wie folgt darstellt:

Stichprobe X (human)			Stichprobe Y (bovin)	
i	$X_i$		j	$Y_j$
1	4,24		1	0,34
2	4,14		2	1,65
3	3,79		3	0,59
4	4,11		4	0,57
5	4,14			
6	4,27			
7	4,46			
8	4,47			
$\sum_{i=1}^n X_i$	33,62		$\sum_{j=1}^m Y_j$	3,15

Tabelle 1: Wertetabelle Students-t-Test

Hieraus ergeben sich: n (Probenumfang human)= 8 und m (Probenumfang bovin) = 4

Im Vorfeld des Tests sind einige statistische Größen der Stichproben zu ermitteln, da sie an anderer Stelle benötigt werden.

### Stichprobenmittel der beiden Stichproben:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i = \frac{1}{8} \sum_{i=1}^8 X_i = \frac{1}{8} 33,62 = 4,2025$$

$$\bar{Y} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m Y_j = \frac{1}{4} \sum_{j=1}^4 Y_j = \frac{1}{4} 3,15 = 0,7875$$

### Stichprobenvarianz der beiden Stichproben:

$$S_X^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 = \frac{1}{8-1} \sum_{i=1}^8 (X_i - \bar{X})^2 = \frac{1}{7} [(4,24 - 4,2025)^2 + (4,14 - 4,2025)^2 + \dots + (4,47 - 4,2025)^2]$$

$$\Leftrightarrow S_X^2 = 0,04719$$

$$S_Y^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (Y_j - \bar{Y})^2 = \frac{1}{4-1} \sum_{j=1}^4 (Y_j - \bar{Y})^2 = \frac{1}{3} [(0,34 - 0,7875)^2 + (1,65 - 0,7875)^2 + \dots + (0,57 - 0,7875)^2]$$

$$\Leftrightarrow S_Y^2 = 0,34349$$

### Freiheitsgrade der t - Verteilung:

$$v = \frac{\left( \frac{S_X^2}{n} + \frac{S_Y^2}{m} \right)^2}{\left( \frac{S_X^2}{n} \right)^2 \frac{1}{n-1} + \left( \frac{S_Y^2}{m} \right)^2 \frac{1}{m-1}} = \frac{\left( \frac{0,04719}{8} + \frac{0,34349}{4} \right)^2}{\left( \frac{0,04719}{8} \right)^2 \frac{1}{8-1} + \left( \frac{0,34349}{4} \right)^2 \frac{1}{4-1}} = 3,4194 \approx 3$$

Nimmt  $v$  keine natürliche Zahl an, ist die Anzahl der Freiheitsgrade auf die nächst kleinere natürliche Zahl abzurunden.

Weiterhin muss vor der Testdurchführung das Signifikanzniveau  $\alpha$  festgelegt werden, welches ein Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit der Testentscheidung darstellt. In dieser Studie beträgt  $\alpha = 0,05$ , was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht. Bei  $\alpha < 0,05$  handelt es sich somit um einen signifikanten Unterschied.

**Berechnung der Teststatistik:**

$$\tilde{t} = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{\sqrt{\frac{S_X^2}{n} + \frac{S_Y^2}{m}}} = \frac{4,2025 - 0,7875}{\sqrt{\frac{0,04719}{8} + \frac{0,34349}{4}}} = 11,2729$$

$\tilde{t}$  ist die Test- oder Prüfvariable, welche in der Testentscheidung mit dem kritischen Wert verglichen wird.

**Ermittlung des Kritischen Wertes t:**

$$t_{[v]; 1 - \frac{\alpha}{2}} = t_{[3]; 1 - \frac{0,05}{2}} = t_{[3]; 0,975} = 3,182$$

Der kritische Wert wird einer entsprechenden Tabelle entnommen.

**Testentscheidung:**

Beide Verteilungen unterscheiden sich signifikant, falls gilt:

$$|\tilde{t}| > t_{[v]; 1 - \frac{\alpha}{2}} \Leftrightarrow |\tilde{t}| > t_{[3]; 1 - \frac{0,05}{2}} \Leftrightarrow |\tilde{t}| > t_{[3]; 0,975} \Leftrightarrow |11,2729| > 3,182 \Leftrightarrow 11,2729 > 3,182$$

Da die Bedingung erfüllt ist, lässt dies darauf schließen, dass sich die Stichproben signifikant unterscheiden. [Universität Saarland; Papula 2001; Hartung 2002; Runde 2005]

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Lichtmikroskopie

Während der 84-tägigen Versuchsdauer, bildete sich im Verlauf ein zunehmend dichter werdender mikroskopischer Zellrasen (vergleiche Abbildung 5 und Abbildung 6).

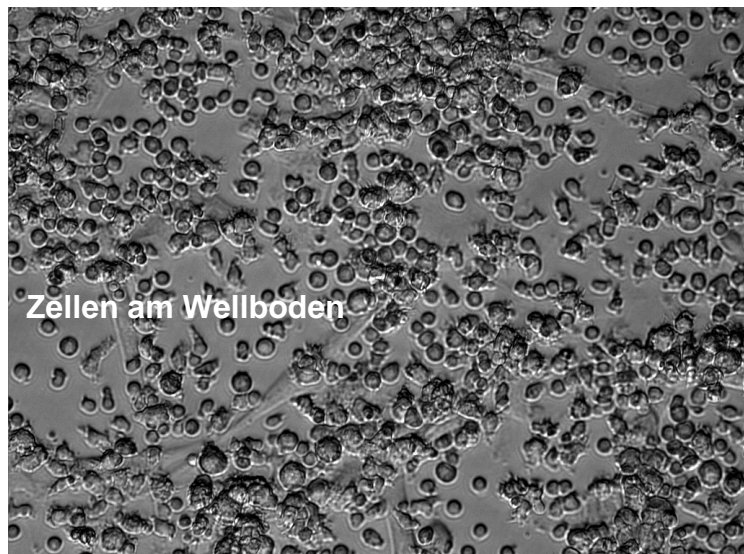


Abbildung 5: Zellen in der ersten Woche nach Versuchsbeginn

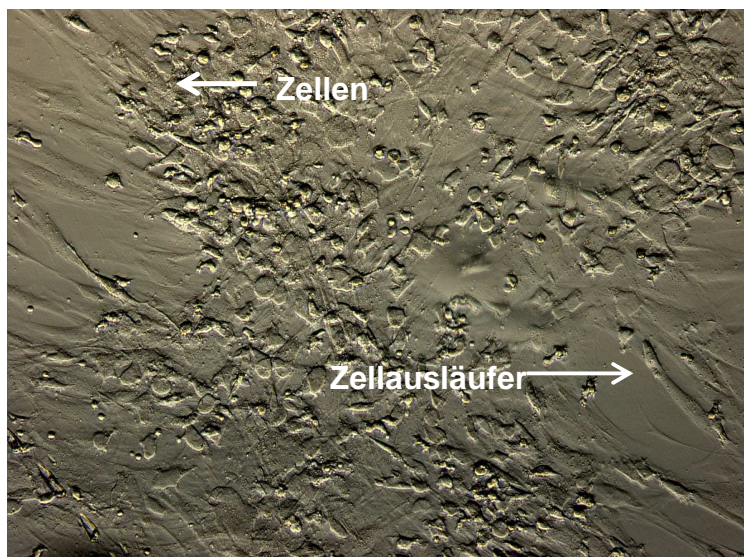


Abbildung 6: Wellboden mit PES-sterilisierten Knochenplättchen - 8 Wochen nach Versuchsbeginn

Zu Beginn des zwölfwöchigen Versuchszeitraumes finden sich viele Rundzellen, die man als noch undifferenzierten Zellen bezeichnen kann (siehe Abbildung 5). Nach und nach differenzieren sich die Zellen, bilden Zellausläufer und kollagene Strukturen (siehe Abbildung 6).

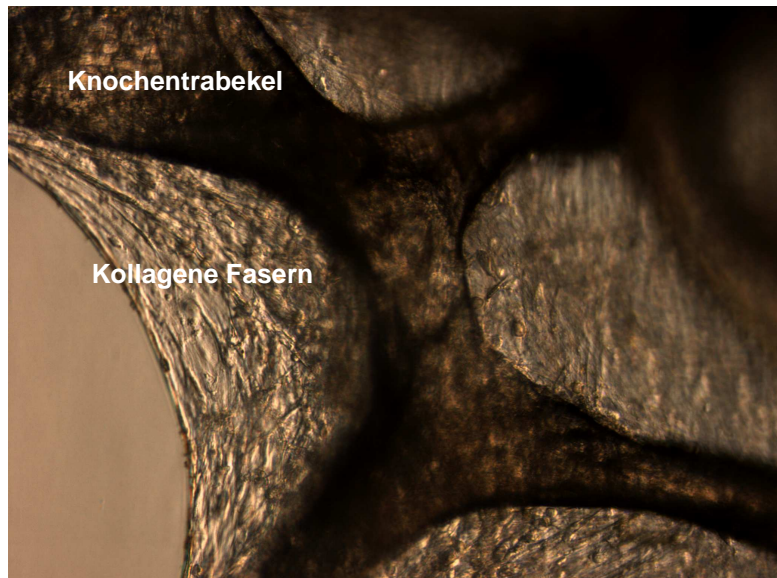


Abbildung 7: Knochenplättchen, PES-Verfahren - 12 Wochen nach Versuchsbeginn

In den Knochenplättchen zeigen sich zwischen den einzelnen Knochentrabekeln kollagene Strukturen und Zellen, die die Grundlage für Knochenanbau darstellen (siehe Abbildung 7).

### 3.2 Trypanblaufärbung

Nach 12 Wochen erfolgte eine Vitalitätsbestimmung nach Trypanblaufärbung und Auszählung in der Neubauer-Zählkammer.

<b>Sterilisationsverfahren</b>	<b>Vitale Zellen</b>
PES-Verfahren	69,7%
Tutoplast®-Verfahren	63,5%

Bei der Trypanblaufärbung und anschließender mikroskopischer Auszählung der vitalen Zellen zeigte sich ein wesentliches Problem. Viele vitale Zellen, die in den Knochentrabekeln gewachsen waren, ließen sich nicht ablösen. Somit war das Ergebnis der Vitalitätsbestimmung nicht verwertbar. Mikroskopisch zeigte sich, dass das Zellwachstum bei den Tutoplast®-sterilisierten Knochenplättchen besser war als bei dem PES-Verfahren.

### 3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde am Ende des Versuchszeitraumes von 12 Wochen durchgeführt. Dabei zeigten sich im Vergleich zur 0-Probe vor der Inkubationszeit mit den Knochenmarksstammzellen, die Ausbildung kollagener Strukturen und Zellausläufer. Einige Zellen fanden sich zwischen den Knochen trabekeln (siehe Abbildung 8).

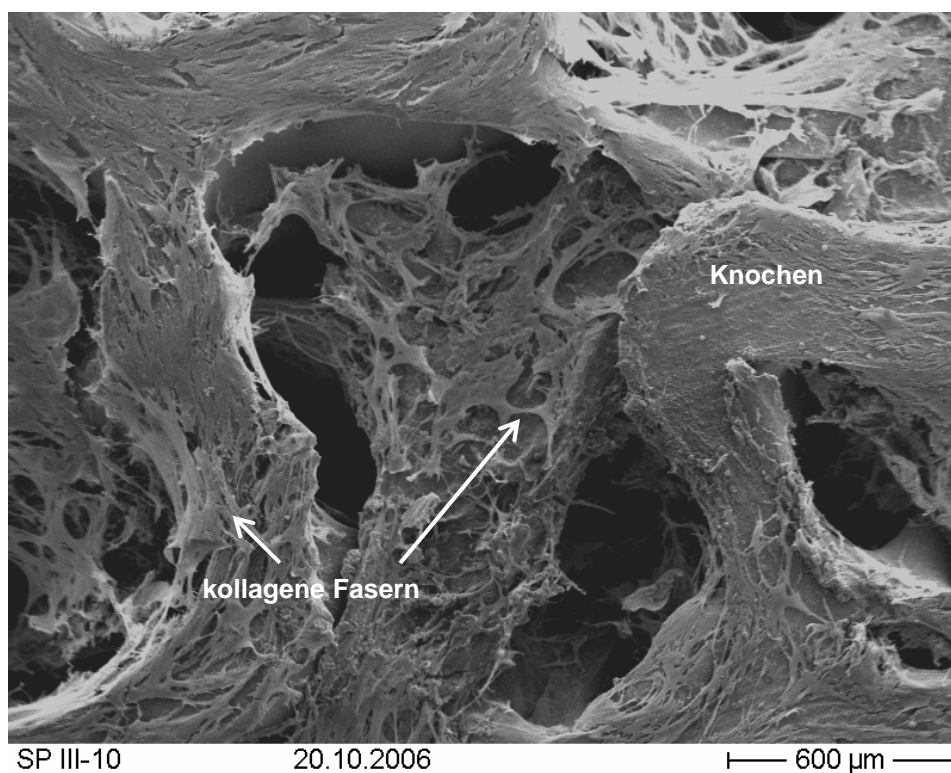


Abbildung 8: Knochen, PES-Verfahren - 12 Wochen nach Versuchsbeginn

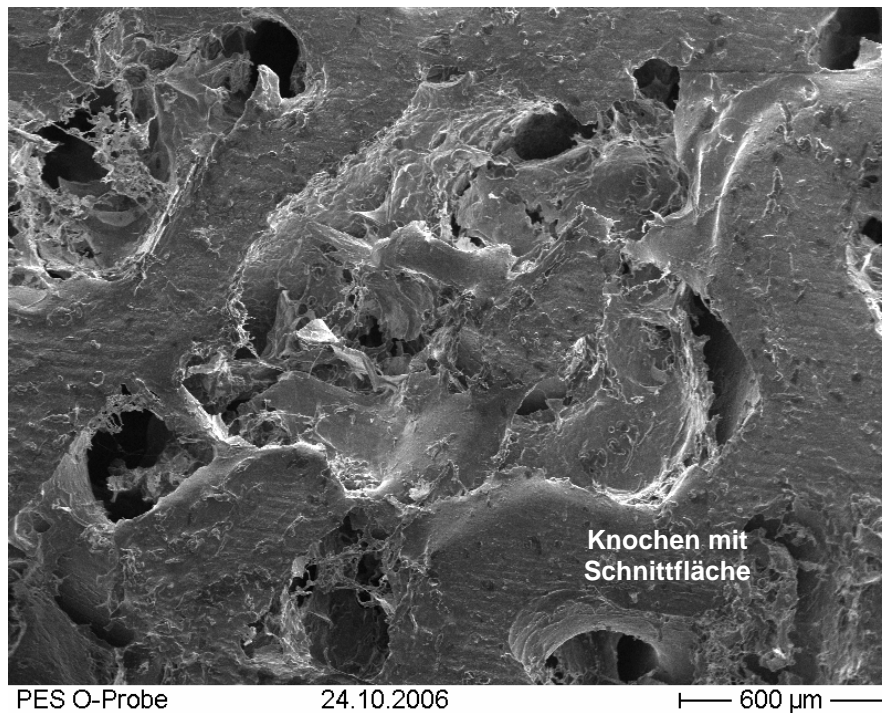


Abbildung 9: Knochen, 0-Probe, PES-Verfahren

In der 0-Probe des Knochens, der nach dem PES-Verfahren sterilisiert wurde, erkennt man den Knochen wie er sich direkt nach der Sterilisation zeigte. Man erkennt noch die Strukturen im Knochen, die vom Sägeblatt hervorgerufen wurden. Außerdem ist raue Knochenstruktur zu sehen (siehe Abbildung 9)



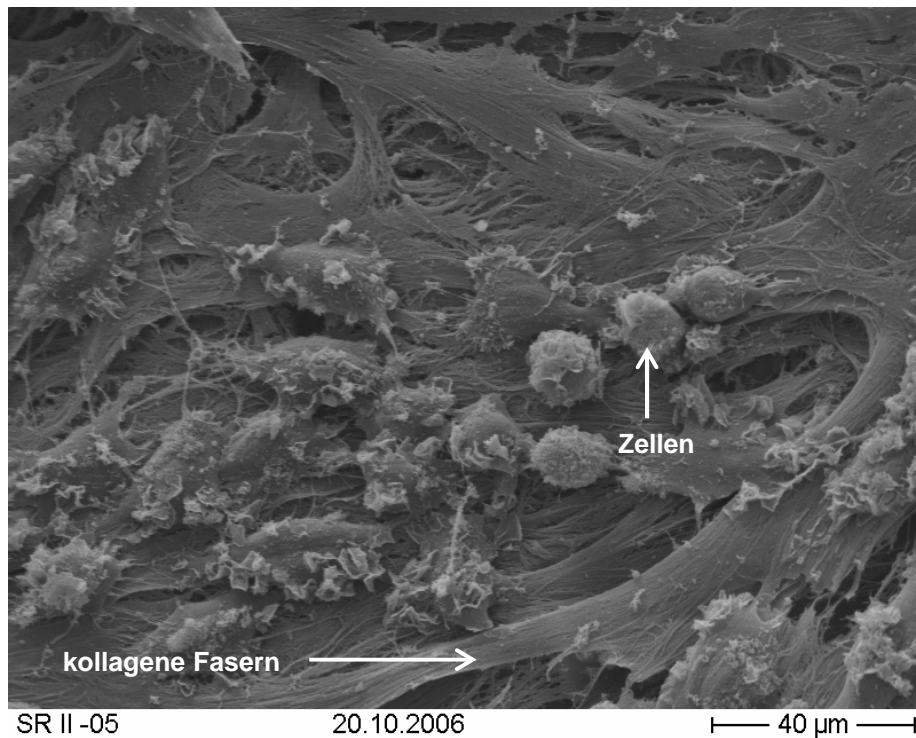


Abbildung 10: Tutoplast®-Verfahren - 12 Wochen nach Versuchsbeginn

In der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung des bovinen Knochens, der nach dem Tutoplast®- Verfahren behandelt wurde, zeigte sich, dass sich ein Zellrasen auf den Knochentrabekeln gebildet hatte. Man erkennt einige Rundzellen sowie größere Zellen mit Zellausläufern. Des Weiteren sieht man kollagene Strukturen (siehe Abbildung 10).

### 3.4 pH-Werte

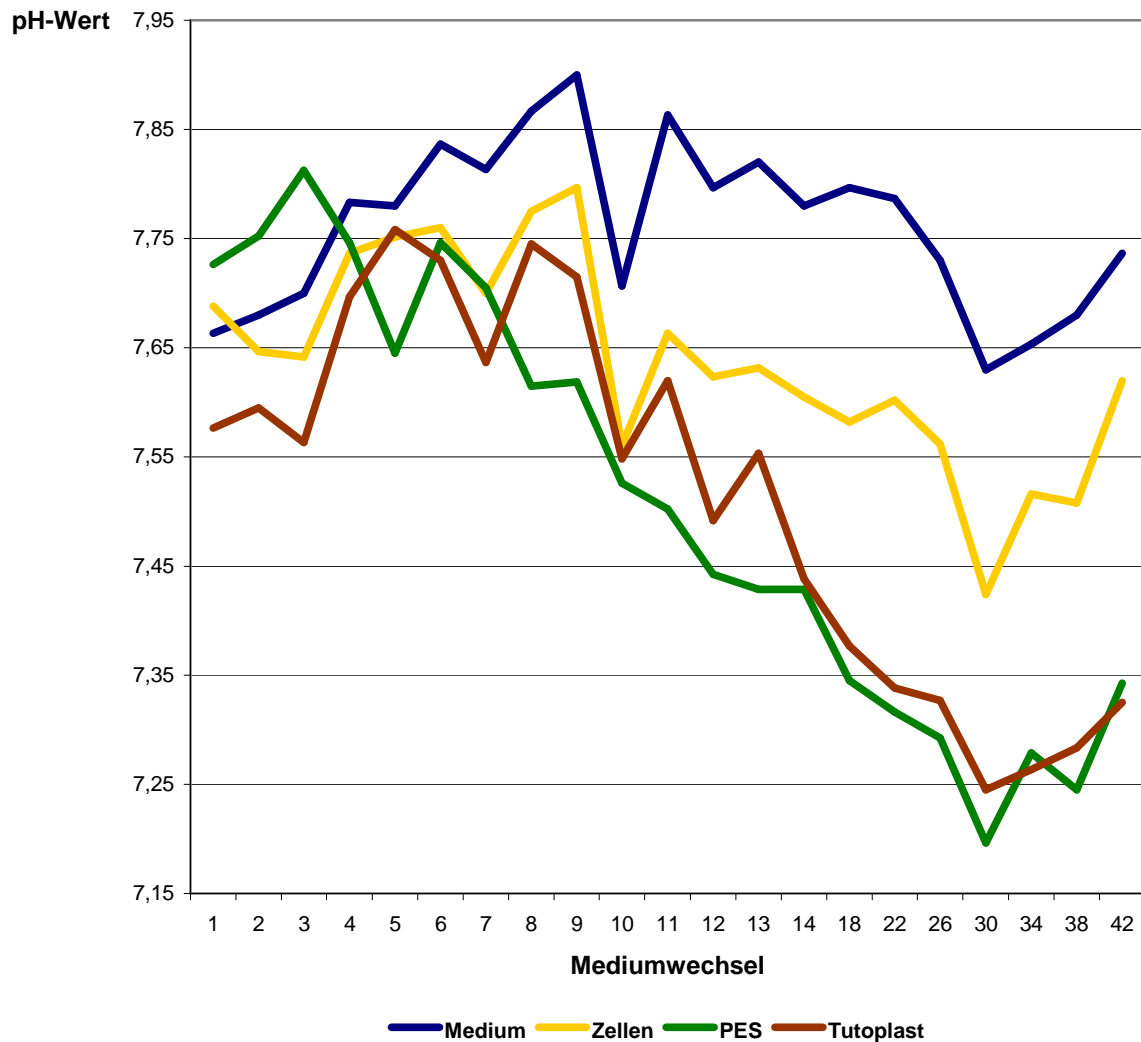


Abbildung 11: Vergleich der pH – Werte von Medium, Zellen, Tutoplast®- und PES-sterilisierten Knochenplättchen

Bei den regelmäßigen pH-Wert - Bestimmungen des Mediumüberstandes, zunächst über 28 Tage alle 48 Stunden, gefolgt von den Bestimmungen bei jedem 4. Wechsel, zeigten sich diverse Unterschiede.

Die pH-Werte lagen während des gesamten Versuchszeitraumes im leicht alkalischen Bereich, zwischen 7,19 und 7,9. Es zeigte sich, dass die pH-Werte mit lediglich Medium, während der 84 Tage stets über denen von Zellen und mit

Knochenplättchen versehenen Wells lagen. Bei allen gab es einen Anstieg des pH-Wertes am 18.Tag (9.Mediumwechsel), gefolgt von einem Abfall am 20. Tag (10. Mediumwechsel). Der niedrigste pH-Wert lag bei allen am 60. Tag beim 30. Mediumwechsel vor. Gegen Ende des Versuchs stieg der Wert wieder an. Dabei war die Differenz von Medium zu den anderen 3 Versuchsreihen größer (siehe Abbildung 11).

Zu bemerken ist, dass es bei diesen stetigen Schwankungen auch Unterschiede in den einzelnen Verfahren gab. So zeigten sich nach dem 10. Mediumwechsel im Mediumüberstand mit Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen stets die geringsten pH-Werte mit bis zu 7,25/ 7,19. Bei der statistischen Auswertung finden sich nach dem ersten Drittel des Versuchszeitraumes signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Medien. So gibt es generell eine Differenz zwischen nur Medium im Vergleich zu dem Medium, in dem sich sterilisierte Knochenplättchen befinden. Des Weiteren findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem nur zellhaltigem Medium und dem mit Knochenplättchen versehenen Medium. Die pH-Werte des Mediums von den PES- und Tutoplast®-behandelten Knochen differieren jedoch nicht signifikant voneinander.

### **3.5 Zytokinausschüttung**

Während der ersten 4 Wochen erfolgte bei jedem Mediumwechsel aus dem abgenommenen Mediumüberstand die Bestimmung von IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ . Danach wurden diese Zytokine wöchentlich mittels ELISA bestimmt.

#### **3.5.1 IL-6-Ausschüttung**

Bei der IL-6-Ausschüttung kommt es direkt zu Beginn zu einem Peak, der vor allem bei den Zellen und bei den PES-sterilisierten Plättchen zu sehen ist. Im Verlauf fällt die IL-6 Produktion ab, um danach wieder stetig anzusteigen. Nach 36 Tagen erreicht die Produktion ein Plateau. Gegen Ende des Versuchszeitraumes sinkt die Ausschüttung wieder. Generell findet sich bei den Tutoplast®-sterilisierten Plättchen die geringste Ausschüttung (siehe Abbildung 12). Zellen und PES-Verfahren unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Dagegen ist eine signifikante Differenz zwischen PES und Tutoplast® zu sehen. Somit ist die Produktion von IL-6 bei den PES-sterilisierten Knochen größer als bei dem Vergleichsverfahren.

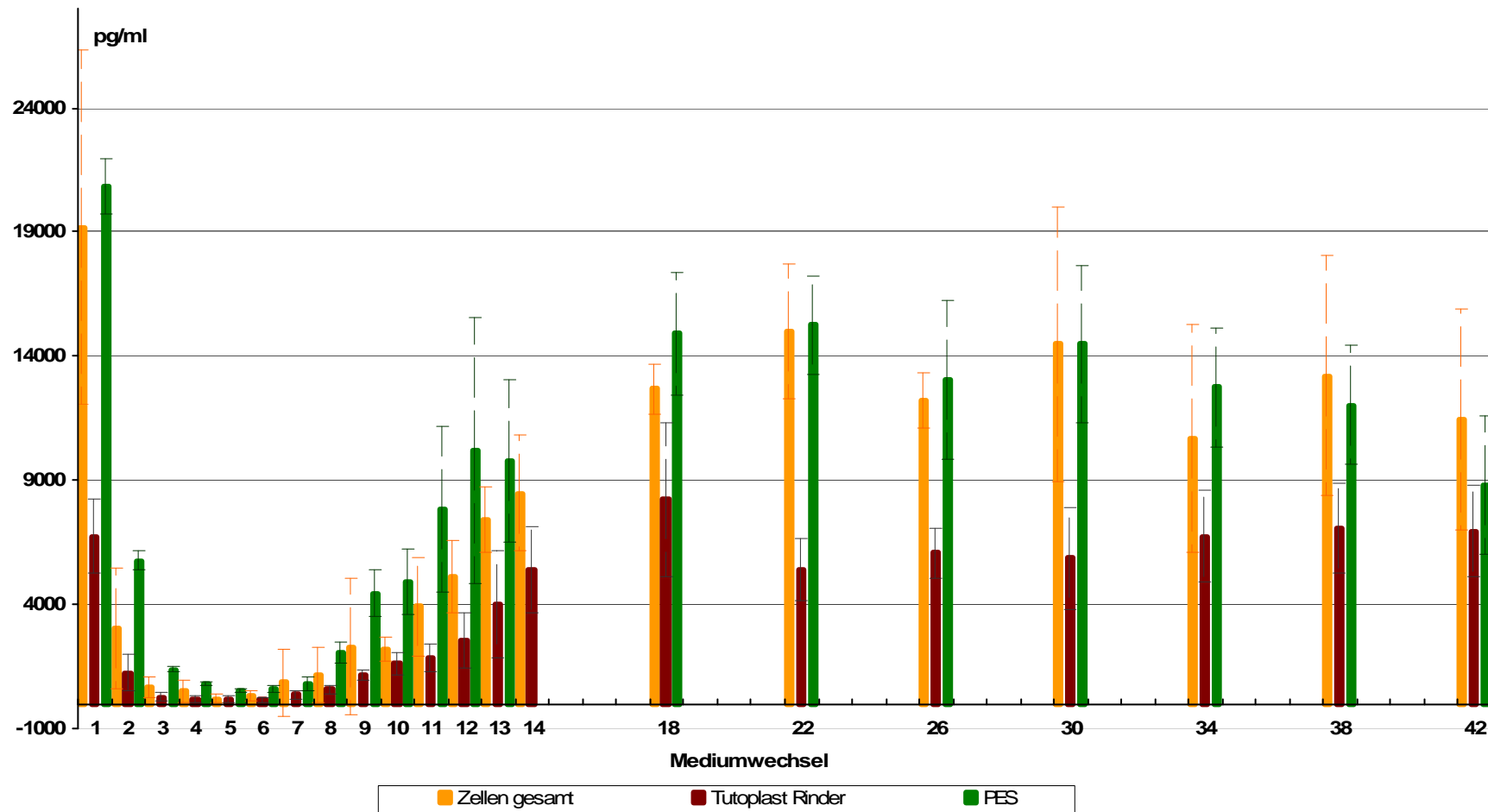


Abbildung 12: Vergleich der IL -6-Ausschüttung in pg/dl von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen

<b>Mediumwechsel</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>Zellen [pg/ml]</b>	19184	3033	652	514	195	322	869	1156	2294	2201	3915	5125	7433	8480
<b>Tutoplast® [pg/ml]</b>	6734	1257	282	177	166	168	375	566	1146	1617	1829	2544	4014	5412
<b>PES [pg/ml]</b>	20822	5770	1397	797	555	589	808	2038	4448	4924	7823	10200	9781	
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. Tutoplast®</b>	0,1234	0,5181	0,3163	0,2786	0,7429	0,2318	0,4685	0,3647	0,4500	0,1428	0,1779	0,0514	0,0377	0,2729
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. PES</b>	0,4644	0,1347	0,0832	0,4595	0,0559	0,1651	0,7690	0,3639	0,3648	0,0008	0,0595	0,0463	0,1815	
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - PES vs. Tutoplast®</b>	0,0000	0,0003	0,0002	0,0019	0,0070	0,0006	0,0098	0,0000	0,0000	0,0001	0,0012	0,0044	0,0055	

Tabelle 2: Vergleich der IL -6-Ausschüttung in pg/dl von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 1-28

<b>Mediumwechsel</b>	<b>18</b>			<b>22</b>			<b>26</b>			<b>30</b>			<b>34</b>			<b>38</b>			<b>42</b>
<b>Zellen [pg/ml]</b>	12695			15011			12215			14475			10672			13220			11467
<b>Tutoplast® [pg/ml]</b>	8229			5414			6077			5862			6752			7045			6945
<b>PES [pg/ml]</b>	14894			15246			13057			14479			12738			12015			8798
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Zellen vs. Tutoplast®</b>	0,0492			0,0178			0,0012			0,0907			0,3040			0,1288			0,1526
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Zellen vs. PES</b>	0,978			0,6258			0,6991			0,8869			0,4666			0,6095			0,2854
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – PES vs. Tutoplast®</b>	0,0132			0,0000			0,0003			0,0003			0,0015			0,0040			0,2036

Tabelle 3: Vergleich der IL -6-Ausschüttung von Zellen, PES und Tutoplast® – Tag 29 – 84

### **3.5.2 TNF-alpha-Ausschüttung**

Die TNF-alpha-Produktion ist insgesamt sehr gering. Nur am zweiten Tag findet man eine geringfügige Ausschüttung. Diese unterscheidet sich jedoch innerhalb der Verfahren nicht signifikant. Während des gesamten Versuchszeitraumes bleibt die Synthese dieses Zytokins unter der Nachweisgrenze (siehe Abbildung 13). Damit ist die TNF-Produktion nicht aussagekräftig.



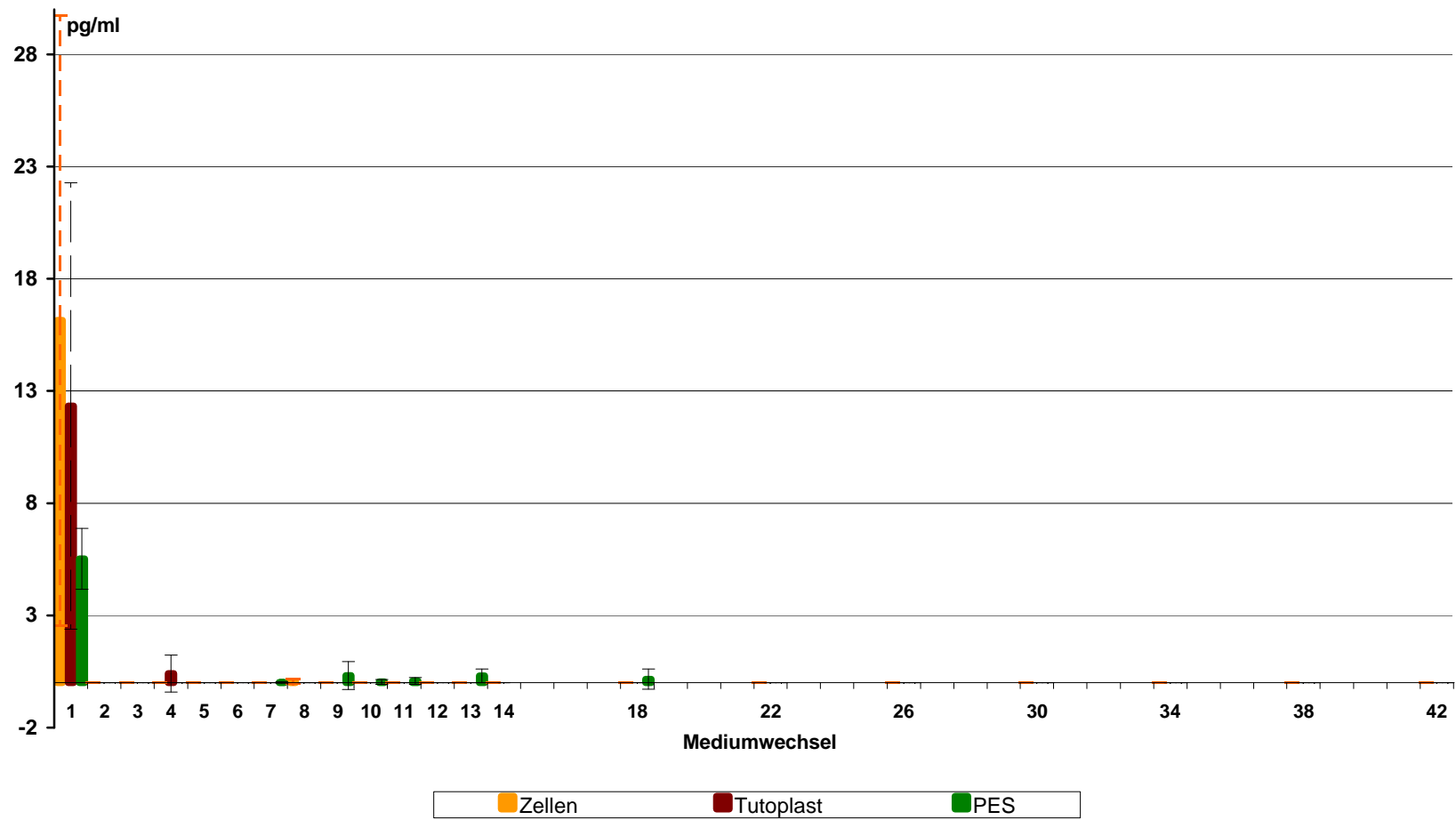


Abbildung 13: Vergleich der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung in pg/ml von Zellen, Tutoplast®- und PES-sterilisierten Knochenplättchen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Zellen [pg/ml]	16,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tutoplast® [pg/ml]	12,33	0,00	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
PES [pg/ml]	5,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,32	0,04	0,08	0,00	0,31	
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. Tutoplast®	0,7046			0,3910				0,4226						
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. PES	0,3082						0,3506	0,4226	0,1915	0,3506	0,1998		0,025	
Signifikanzniveau $\alpha$ – PES vs. Tutoplast®	0,2647			0,3910			0,3506		0,1915	0,3506	0,19,98		0,025	

Tabelle 4: Vergleich der TNF- $\alpha$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 1 – 28

Mediumwechsel	18			22			26			30			34			38			42
Zellen [pg/ml]	0,00			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00
Tutoplast® [pg/ml]	0,00			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00
PES [pg/ml]	0,16			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00			0,00
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. Tutoplast®																			
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. PES	0,3506																		
Signifikanzniveau $\alpha$ – PES vs. Tutoplast®	0,3506																		

Tabelle 5: Vergleich der TNF- $\alpha$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 29 – 84

### **3.5.3 IL-1beta Ausschüttung**

Die IL-1beta-Produktion zeigt zu Beginn ein Maximum. Danach findet nahezu keine Produktion statt. In den ersten acht Tagen kommt es zu einer signifikant höheren Synthese von Interleukin-1 bei den PES-sterilisierten Knochenplättchen. Im Vergleich zu den alleinigen Zellen besteht hingegen kein signifikanter Unterschied. Die Ausschüttung der Zytokine findet hierbei in der ersten Woche statt (siehe Abbildung 14).

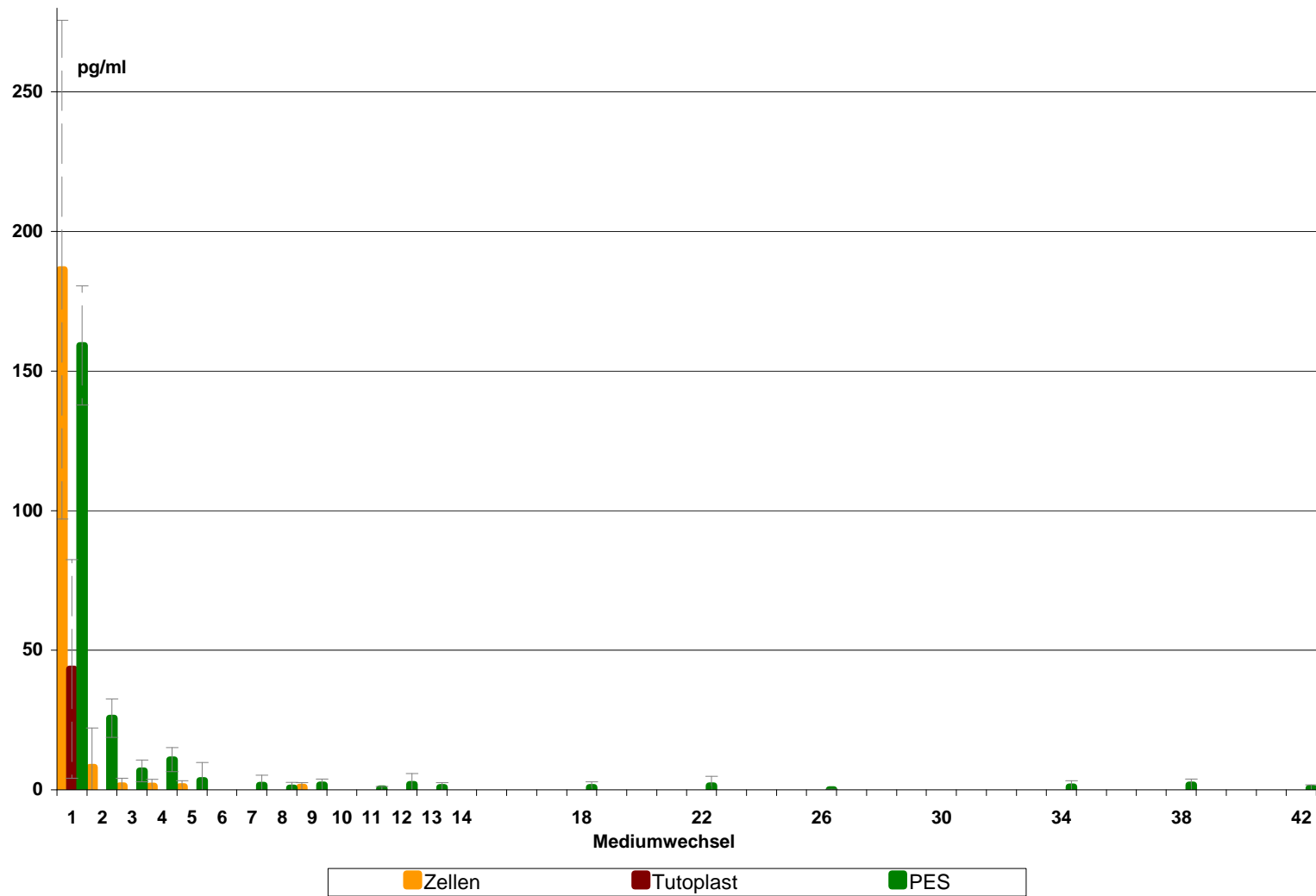


Abbildung 14: Vergleich der IL-1 $\beta$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Zellen [pg/ml]	186,3	8,1	1,5	1,4	1,2	0,0	0	0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Tutoplast® [pg/ml]	43,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PES [pg/ml]	159,2	25,7	6,8	10,8	3,4	0,0	1,7	0,7	1,7	0,0	0,4	2,0	0,9	
Signifikanzniveau $\alpha$ - Zellen vs. PES	0,6524	0,1532	0,0440	0,0025	0,4142		0,2218	0,3506	0,5439		0,1825	0,1926	0,1802	
Signifikanzniveau $\alpha$ - Zellen vs. Tutoplast®	0,0943	0,4226	0,4226	0,4226	0,4226				0,4226					
Signifikanzniveau $\alpha$ - Tutoplast® vs. PES	0,0056	0,0000	0,0017	0,0002	0,1808		0,2218	0,3506	0,0544		0,1825	0,1926	0,1802	

Tabelle 6: Vergleich der IL-1 $\beta$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 1 bis 28

<b>Mediumwechsel</b>	<b>18</b>			<b>22</b>			<b>26</b>			<b>30</b>			<b>34</b>			<b>38</b>			<b>42</b>
<b>Zellen [pg/ml]</b>	0			0			0			0			0			0			0
<b>Tutoplast® [pg/ml]</b>	0,0			0,0			0,0			0,0			0,0			0,0			0,0
<b>PES [pg/ml]</b>	0,9			1,5			0,1			0,0			1,1			1,7			0,6
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. PES</b>	0,2173			0,2338			0,3436						0,1846			0,522			0,1872
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - T-Test Zellen vs. Tutoplast®</b>																			
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – T-Test Tutoplast® vs. PES</b>	0,2173			0,2338			0,3436						0,1846			0,0522			0,1872

Tabelle 7: Vergleich der IL-1 $\beta$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 29 bis 84

#### **3.5.4 IFN-gamma-Ausschüttung**

Die Interferon-Produktion liegt im gesamten Versuchszeitraum im unteren Bereich von wenigen pg/ml (siehe Abbildung 15).

Innerhalb der ersten 28 Tage sieht man eine dezente Synthese des Zytokins, wobei sich bis auf zwei Daten kein signifikanter Unterschied der drei Versuchsgruppen zeigt. An Tag 2 und 26 gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen Tutoplast® und PES zu Gunsten von Tutoplast®. Hingegen differieren zellhaltiges Medium und Tutoplast® nicht signifikant voneinander.



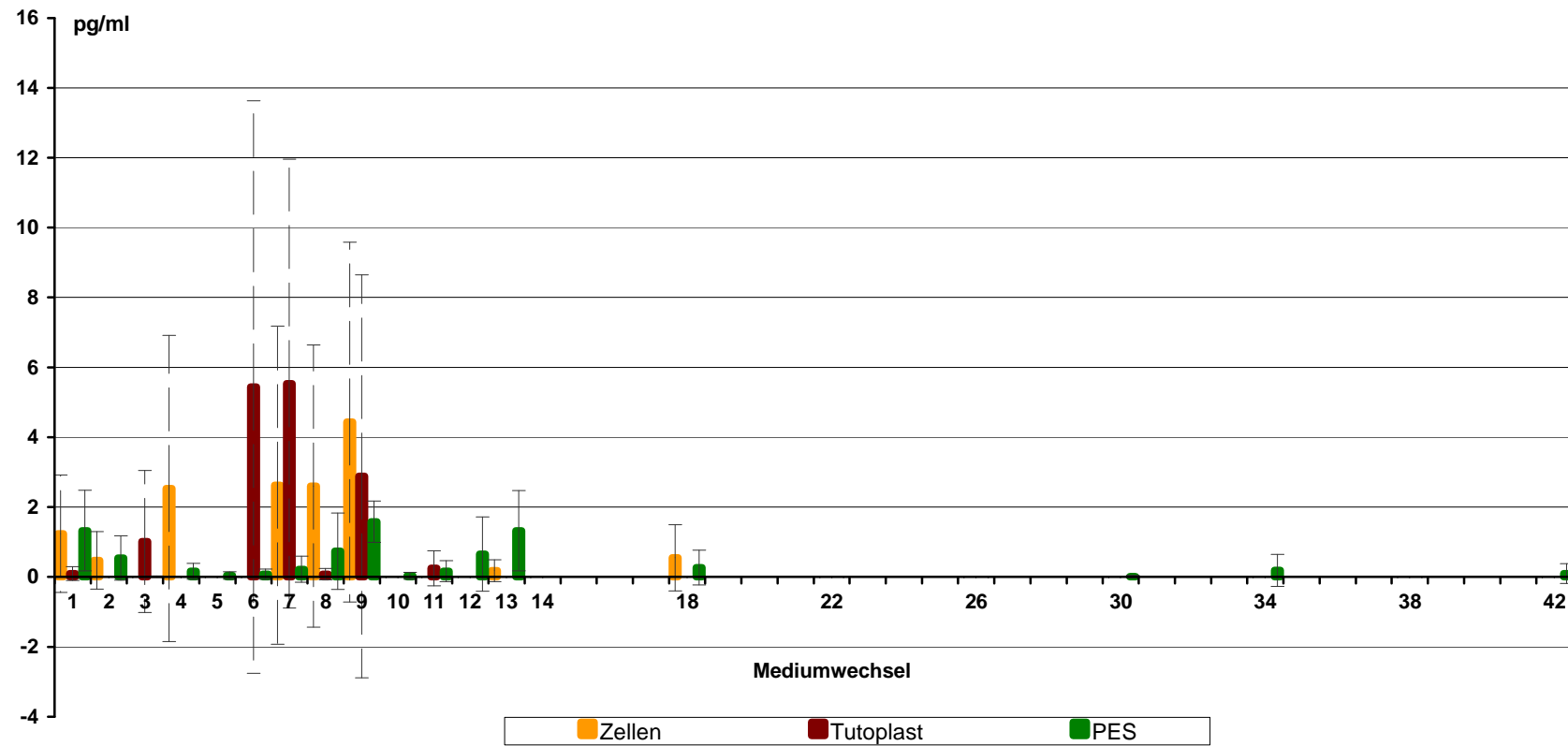


Abbildung 15: Vergleich der IFN- $\gamma$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Zellen [pg/ml]	1,24	0,48	0,00	2,53	0,00	0,00	2,63	2,60	4,43	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
Tutoplast® [pg/ml]	0,10	0,00	1,02	0,00	0,00	5,44	5,53	0,08	2,88	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00
PES [pg/ml]	1,33	0,54	0,01	0,16	0,04	0,08	0,22	0,74	1,58	0,03	0,16	0,65	1,33	
Signifikanzniveau $\alpha$ - Zellen vs. Tutoplast®	0,361	0,423	0,391	0,423		0,276	0,515	0,392	0,724		0,391		0,423	
Signifikanzniveau $\alpha$ - Zellen vs. PES	0,940	0,908	0,351	0,449	0,311	0,174	0,457	0,509	0,438	0,351	0,163	0,125	0,030	
Signifikanzniveau $\alpha$ - Tutoplast® vs. PES	0,020	0,047	0,394	0,079	0,311	0,282	0,197	0,137	0,682	0,351	0,768	0,125	0,014	

Tabelle 8: Vergleich der IFN- $\gamma$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 1 – 28

Mediumwechsel	18			22			26			30			34			38			42
Zellen [pg/ml]	0,55			0,00			0,00			0,00			0,00			0			0
Tutoplast® [pg/ml]	0,00			0,00			0,00			0,00			0,00			0			0
PES [pg/ml]	0,27			0,00			0,00			0,01			0,19			0,00			0,10
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. Tutoplast®	0,423																		
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. PES	0,668									0,351			0,278						0,351
Signifikanzniveau $\alpha$ – Tutoplast® vs. PES	0,171									0,351			0,278						0,351

Tabelle 9: Vergleich der IFN- $\gamma$ - Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 29 bis 84

### 3.6 Laktatdehydrogenase

Über den gesamten Versuchszeitraum lässt sich LDH messen. Zunächst kommt es zu einem stetigen Anstieg innerhalb der ersten vier Wochen. Danach bleibt die Konzentration nach einem Maximum am Tag 36 nahezu auf einem Niveau.

Bis zum 10. Tag findet sich bei PES die höchste Konzentration, wobei diese sich von Tutoplast® und Zellen nicht signifikant unterscheidet. Ab Tag 12 bis Tag 16 ist die LDH-Konzentration in dem Medium mit Tutobone® signifikant höher. In den letzten beiden Medienwechseln vor Versuchsende liegt hingegen die Konzentration bei PES höher (siehe Abbildung 16).

Über nahezu den gesamten Versuchszeitraum unterscheiden sich jedoch die LDH-Konzentration von nur zellhaltigem Medium von denen mit Knochen enthaltenen signifikant. Dabei hat die Probe, die lediglich Zellen enthält die geringste LDH-Produktion.

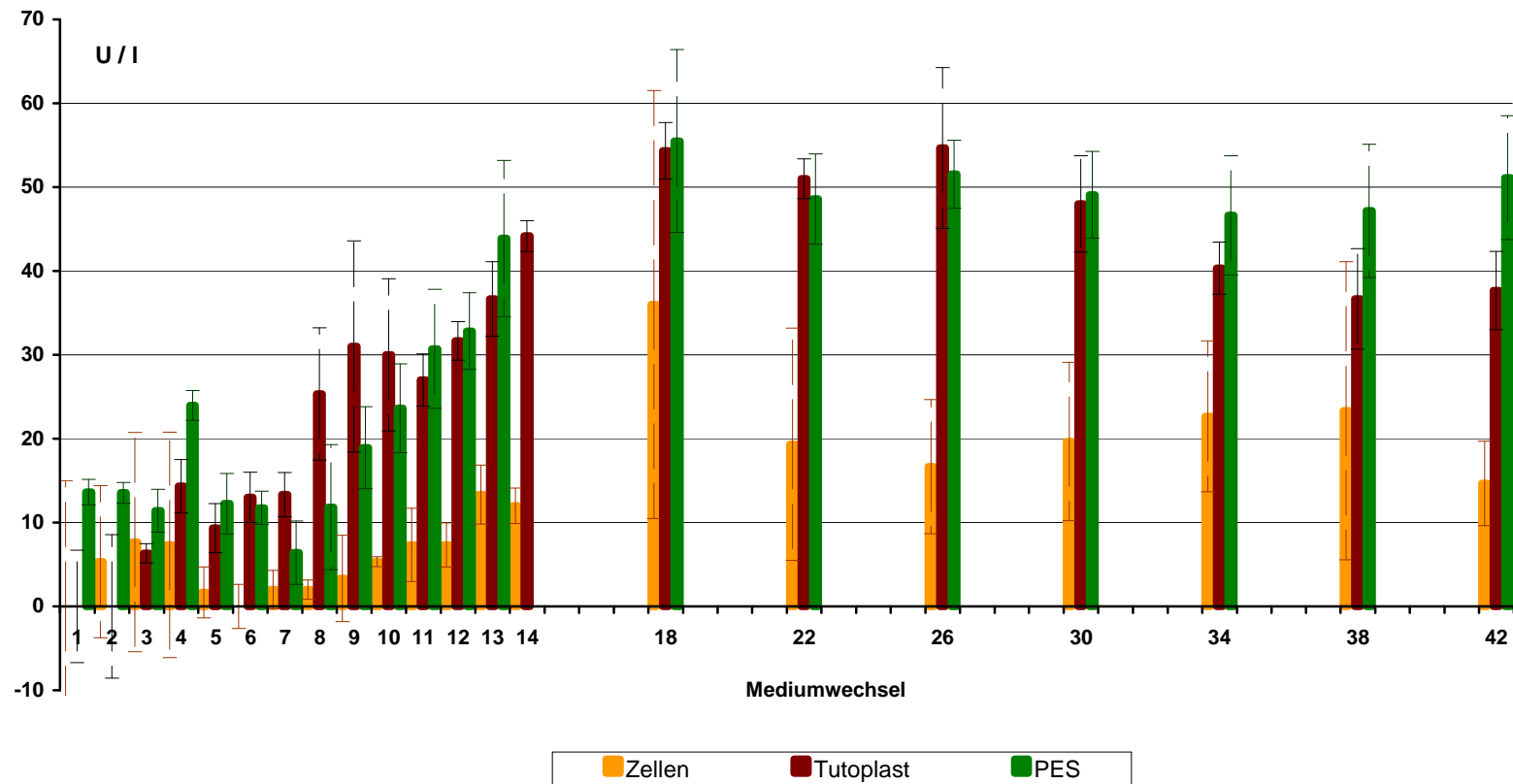


Abbildung 16: Vergleich der LDH- Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen

<b>Mediumwechsel</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>Zellen [U/l]</b>	0,00	5,33	7,67	7,33	1,67	0,00	2,00	2,00	3,33	5,33	7,33	7,33	13,33	12
<b>Tutoplast® [U/l]</b>	0,00	0,00	6,33	14,33	9,33	13,00	13,33	25,33	31,00	30,00	27,00	31,67	36,67	44,17
<b>PES [U/l]</b>	13,63	13,54	11,42	23,96	12,25	11,75	6,42	11,83	18,92	23,63	30,71	32,83	43,88	
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. Tutoplast®</b>	0,1234	0,6362	0,8234	0,1377	0,0175	0,0002	0,0001	0,0061	0,0209	0,0016	0,0005	0,0003	0,0003	0,0026
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. PES</b>	0,4420	0,5358	0,8782	0,3671	0,0005	0,0011	0,0100	0,0363	0,0052	0,0010	0,0001	0,0001	0,0000	0,1946
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Tutoplast® vs. PES</b>	0,1966	0,3373	0,2191	0,0619	0,9103	0,0123	0,0062	0,0212	0,2489	0,0614	0,9670	0,4854	0,4151	0,0006

Tabelle 10: Vergleich der LDH- Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen abzüglich des Leerwertes von Medium – Tag 1 – 28

<b>Mediumwechsel</b>	<b>18</b>			<b>22</b>			<b>26</b>			<b>30</b>			<b>34</b>			<b>38</b>			<b>42</b>
<b>Zellen [U/l]</b>	36			19,33			16,67			19,67			22,67			23,33			14,67
<b>Tutoplast® [U/l]</b>	54,33			51,00			54,67			48,00			40,33			36,67			37,67
<b>PES [U/l]</b>	55,5			48,58			51,54			49,08			46,63			47,17			51,13
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Zellen vs. Tutoplast®</b>	0,3436			0,0537			0,0070			0,025			0,0457			0,3343			0,0069
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Zellen vs. PES</b>	0,3436			0,0588			0,0169			0,0276			0,0214			0,1385			0,0006
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Tutoplast® vs. PES</b>	1,000			0,2384			0,7786			0,4435			0,3757			0,0471			0,0026

Tabelle 11: Vergleich der LDH- Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 29 – 84

### **3.7 Alkalische-Phosphatase-Produktion**

Alkalische Phosphatase ist über den gesamten Versuchszeitraum nahezu nicht messbar. Daher kann man behaupten, dass dieses Enzym nicht nachweisbar ist und daher nicht von den Zellen produziert wird (siehe Abbildung 17).



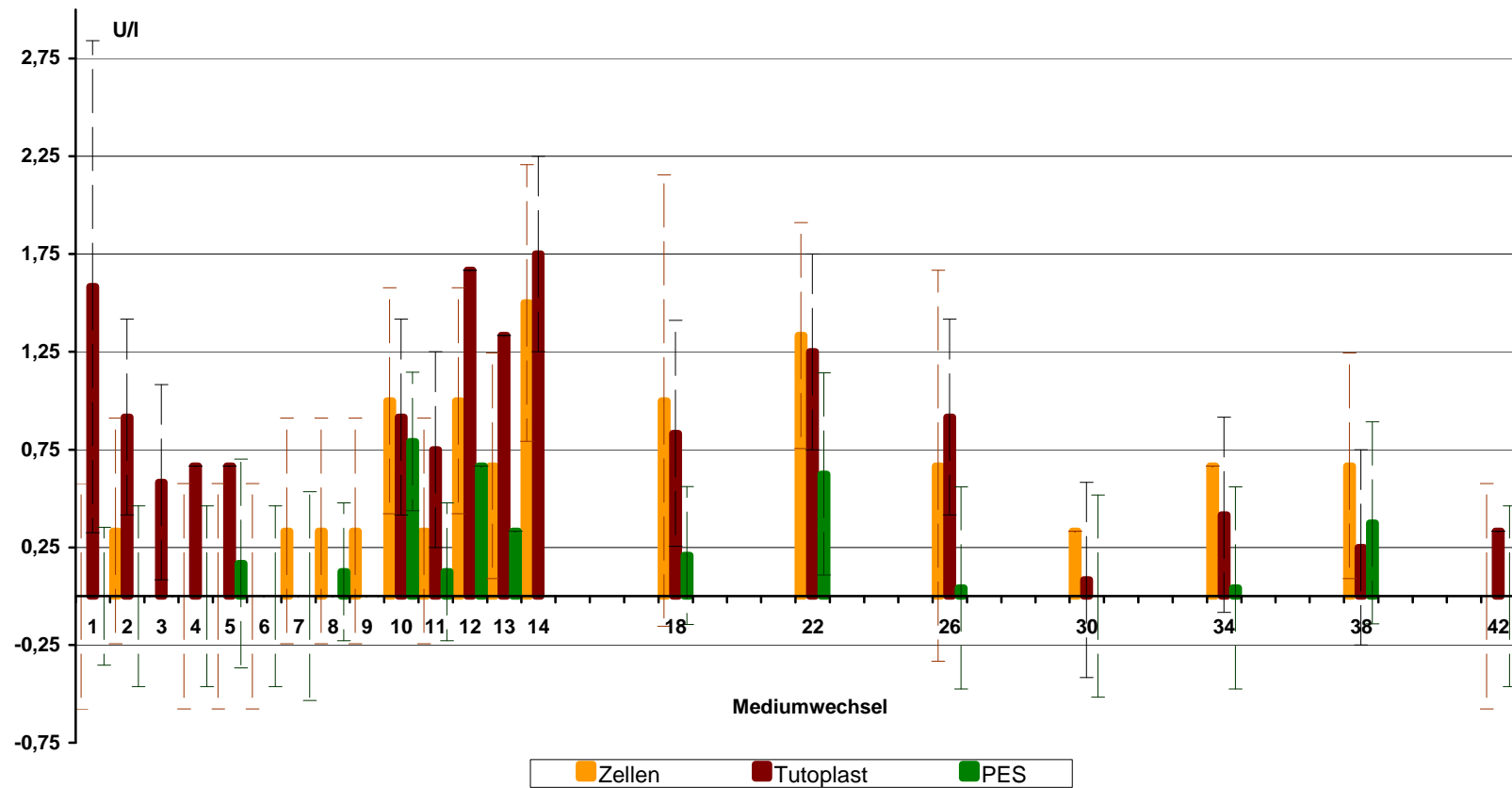


Abbildung 17: Vergleich der AP-Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Zellen [U/l]	0	0,25	0	0,25	0	0	0,25	0,25	0,25	0,75	0,25	0,75	0,75	1,5
Tutoplast® [U/l]	1,75	1,25	0,75	1	0,5	0	0	0	0	1,25	0,75	2	1	1,75
PES [U/l]	1,75	1,25	0,75	1	0,5	0	0	0	0	1,25	0,75	2	1	
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. Tutoplast®	0,133	0,092	0,058	0,184	0,723		0,423	0,423	0,423	0,720	0,373	0,225	0,423	0,326
Signifikanzniveau $\alpha$ – Zellen vs. PES		0,423		0,423	0,690		0,423	0,605	0,423	0,266	0,605	0,225	0,423	
Signifikanzniveau $\alpha$ – PES vs. Tutoplast®	0,133	0,015	0,058		1,000			0,351		0,012	0,081			

Tabelle 12: Vergleich der AP-Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 1- 28

<b>Mediumwechsel</b>	<b>18</b>			<b>22</b>			<b>26</b>			<b>30</b>			<b>34</b>			<b>38</b>			<b>42</b>
<b>Zellen [U/l]</b>	0,75			1,25			0,5			0,5			0,75			0,75			0
<b>Tutoplast® [U/l]</b>	1			1,25			1,25			0			0,25			0,25			0,5
<b>PES [U/l]</b>	0			0,625			0			0,625			0,375			0,375			0
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Zellen vs. Tutoplast®</b>	1,000			0,851			0,482			0,423			0,373			0,373			0,182
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – Zellen vs. PES</b>	0,377			0,151			0,423			0,494			0,494			0,494			0,000
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> – PES vs. Tutoplast®</b>	0,145			0,088			0,015			0,011			0,700			0,700			0,182

Tabelle 13: Vergleich der AP-Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 29 - 84

### **3.8 Laktat -Produktion**

Die Laktatproduktion zeigt einen stetigen Anstieg bis zum 18. Mediumwechsel. Danach bleibt die Konzentration nahezu konstant. Zellhaltiges Medium liefert hierbei die geringste Menge. In den ersten 4 Wochen ist die Laktatausschüttung des Mediums mit den PES enthaltenen Knochen signifikant höher als die der mit Tutobone®. Es besteht aber kein signifikanter Unterschied zu nur zellhaltigem Medium. Ab dem 36. Tag gibt es nur noch einen signifikanten Unterschied zwischen Zellen und PES. PES weist stets die größte Synthese von Laktat auf (siehe Abbildung 18)

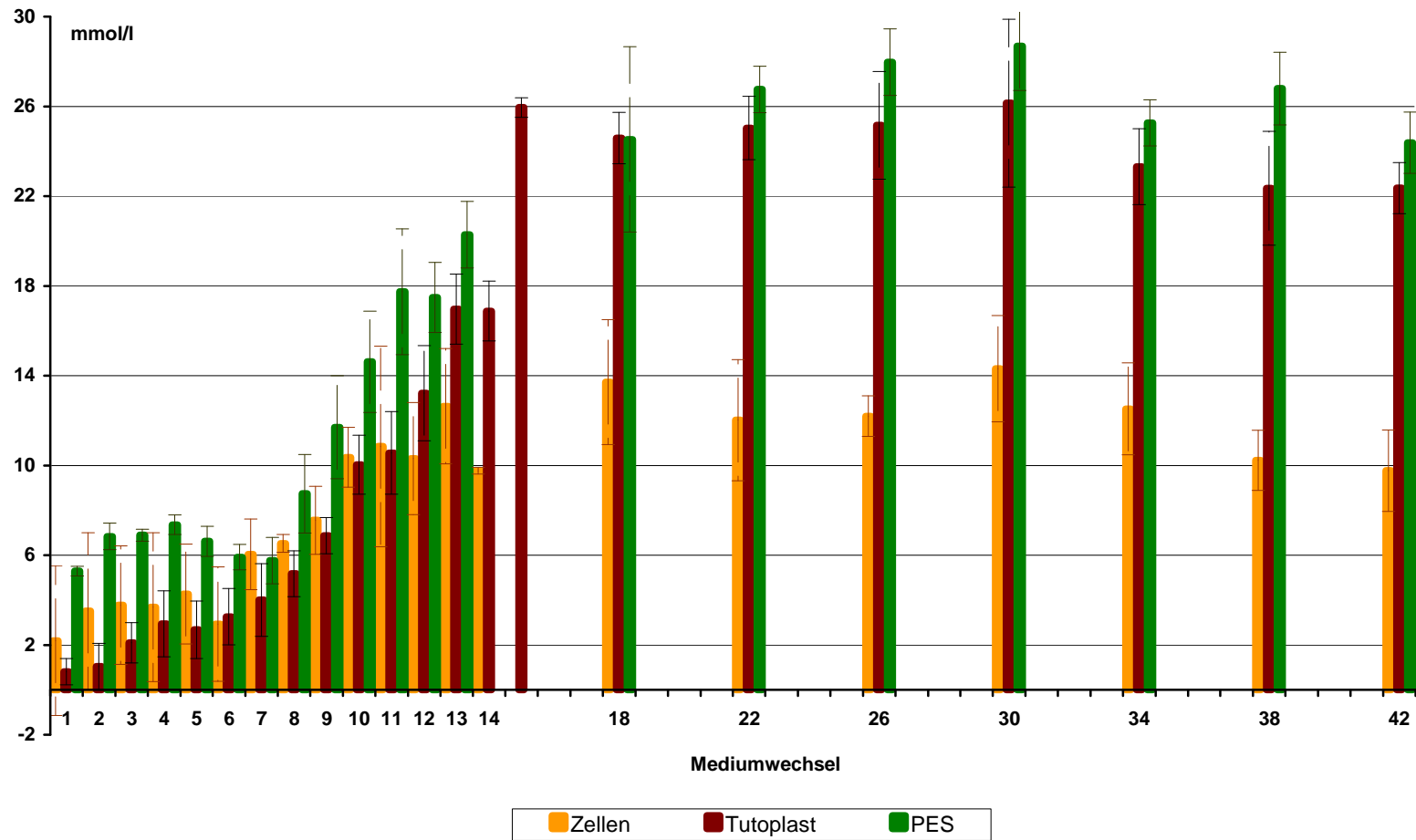


Abbildung 18: Vergleich der Laktat-Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen

Mediumwechsel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Zellen [mmol/l]	2,19	3,51	3,77	3,69	4,27	2,93	6,04	6,53	7,56	10,36	10,85	10,31	12,64	9,77
Tutoplast® [mmol/l]	0,81	1,05	2,10	2,94	2,68	3,26	4,00	5,18	6,87	10,03	10,56	13,22	16,96	16,88
PES [mmol/l]	5,29	6,84	6,89	7,36	6,62	5,92	5,76	8,74	11,70	14,62	17,74	17,48	20,28	
Signifikanzniveau $\alpha$ - Zellen vs. Tutoplast®	0,560	0,413	0,626	0,768	0,712	0,483	0,957	0,629	0,557	0,682	0,606	0,274	0,207	0,048
Signifikanzniveau $\alpha$ - Zellen vs. PES	0,269	0,256	0,218	0,203	0,287	0,202	0,692	0,214	0,149	0,170	0,177	0,129	0,130	0,423
Signifikanzniveau $\alpha$ - Tutoplast® vs. PES	0,001	0,001	0,002	0,016	0,008	0,050	0,232	0,005	0,001	0,000	0,001	0,025	0,020	0,000

Tabelle 14: Vergleich der Laktat-Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 1 – 28

<b>Mediumwechsel</b>	<b>18</b>		<b>22</b>		<b>26</b>		<b>30</b>		<b>34</b>		<b>38</b>		<b>42</b>
<b>Zellen [mmol/l]</b>	13,71		12,02		12,20		14,31		12,52		10,23		9,77
<b>Tutoplast® [mmol/l]</b>	24,59		25,04		25,16		26,14		23,31		22,35		22,36
<b>PES [mmol/l]</b>	24,53		26,76		27,97		28,68		25,26		26,80		24,38
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. Tutoplast®</b>	0,537		0,393		0,356		0,379		0,307		0,334		0,274
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Zellen vs. PES</b>	0,080		0,046		0,028		0,031		0,026		0,018		0,012
<b>Signifikanzniveau <math>\alpha</math> - Tutoplast® vs. PES</b>	0,160		0,192		0,142		0,134		0,247		0,103		0,192

Tabelle 15: Vergleich der Laktat-Ausschüttung von Zellen, Tutoplast®- und PES- sterilisierten Knochenplättchen – Tag 29 - 84

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methode - Knochenmarkszellkultur

Diese Studie basierte auf einer humanen Knochenmarkszellkultur. Damit fanden sich in vitro ähnliche Bedingungen wie in vivo. Das Knochenmark fiel im Rahmen der Endoprothetik eines Hüftgelenkes an. Hieraus wurde durch ein validiertes Verfahren eine Kultur aus humanen Zellen gewonnen. Damit konnten nahezu identische Umgebungsbedingungen wie im menschlichen Körper geschaffen werden. Denn beim Knochenersatz mit verschiedenen Knochenmaterialien, werden diese im Knochen verankert und haben damit direkten Kontakt zu den Knochenmarkszellen.

Das Verfahren liefert noch einen wesentlichen Vorteil. Tierversuche können damit auf ein Minimum reduziert werden. Außerdem handelt es sich bei diesem Modell um humane Zellen. Im Tierversuch fehlt die Anlehnung an die humane Zellbeschaffenheit. Das liegt unter anderem daran, dass tierische und menschliche Zellen nicht hundertprozentig übereinstimmen und dass immunpathologische Prozesse differieren.

Durch das verwendete Nährmedium werden die Zellen ausreichend versorgt, so dass damit ein Wachstum gewährleistet ist. In der hierbei verwendeten Zellkultur wurden IL-3 und GM-CSF als Wachstumshormone eingesetzt, auf Erythropoetin wurde verzichtet. Damit war gewährleistet, dass nur die weiße Zellreihe proliferierte und es nicht zur Bildung von Erythrozyten kam. Diese hatten für unsere Fragestellung bezüglich des Zytokinprofils keine Bedeutung, da Zytokine alleinig von Zellen der weißen Reihe produziert werden. Zusammenfassend stellt die Knochenmarkszellkultur eine gute Methode zum experimentellen Arbeiten dar.

Die Methode der Knochenmarkszellkultur ist jedoch sehr kosten- und zeitintensiv. Daher ist nur ein kleiner Probenumfang möglich, wodurch die Reproduzierbarkeit vermindert wird. Dennoch liefert sie Daten, die für weitere Versuche, wie klinische oder weitere experimentelle Studien, als Grundlage dienen können.



Die in der Studie verwendeten Knochenplättchen, wurden aus Hüftköpfen hergestellt, die im Rahmen einer Endoprothetik entnommen wurden. Sie hatten allesamt eine einheitliche Größe, womit die Vergleichbarkeit gewährleistet war. Die Rinderknochen wurden extern durch die Firma Tutogen Medical GmbH in Neunkirchen am Brand hergestellt. Beide, humane und xenogene Knochenmaterialien, wiesen die gleiche Größe auf. Der Durchmesser von einem Zentimeter und die Höhe von drei Millimeter gewährleisteten, dass sich humane Knochenmarkszellen ansiedeln und gegebenenfalls Knochenanbau stattfinden konnte. Die Verwendung von fünf Knochenplättchen pro well lieferte den Vorteil, dass sich so auch auf dem Boden und zwischen den Knochen Zellen absetzen und differenzieren konnten. Diese ließen sich dann mikroskopisch gut darstellen.

### ***Die Standardisierbarkeit***

Die Verwendung der Spender für die Knochenmarkszellkultur und für die Knochenplättchen wurde nach gewissen Kriterien festgelegt.

Es wurden Spender, die an einer Coxarthrose erkrankt waren und keine weiteren chronischen Erkrankungen hatten, verwendet. Vorerkrankungen waren ein Ausschlusskriterium. Dies war gewährleistet, da die Hüftköpfe zur Spende für die Knochenbank vorgesehen waren. Des Weiteren wurde vor der Operation eine Eigenblutspende von den Patienten durchgeführt, wodurch die serologische Testung des Patienten erfolgte. Das Maximalalter der Spender wurde auf 80 Jahre festgelegt.

Da diese Kriterien stets befolgt wurden, können in der Knochenmarkszellkultur, bei gleichen Bedingungen, ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Diese lassen sich dann auch auf eine größere Patientenpopulation reproduzieren.

Vor vielen Jahren bestand das Problem darin, dass in Versuchen verschiedene Zellkulturen verwendet wurden, die zum einen nicht humanen Ursprungs, zum anderen hochdifferenzierte Zellen enthielten, die normalerweise keinen direkten

Kontakt zu den Implantaten hatten [Uchida et al. 1987]. Die Verwendung von humanen Knochenmarkszellkulturen, wie von Wilke et al. beschrieben, hat viele Vorteile. Es handelt sich um Zellen menschlichen Ursprungs. Die Zellpopulation befindet sich in der Umgebung orthopädischer Implantate in situ. Neben immunkompetenten und differenzierten Zellpopulationen (B- und T-Zellen), enthält diese Kultur Stammzellen (Vorläuferzellen), die sich je nach Kulturbedingungen in verschiedene Zellarten differenzieren können. Die Beschreibung und Quantifikation der Zelldifferenzierung in vitro gibt gebrauchsfähige Informationen über die Gewebereaktion, die nach Implantation von Materialien in vivo entstehen [Wilke 1995].

Wilke et al. beschrieben 1998 die Bedeutung der Zellkultur in der Testung von Biomaterialien zur Biokompatibilitätsbeurteilung. Sie zeigten, dass Biomaterialien Zellen dazu anregen können auf verschiedene Weisen zu reagieren, welche durch charakteristische Zellaktivitäten wie Zelladhäsion, Migration, Proliferation, ECM-Produktion und Zellzerfall charakterisiert sind. Somit kann das Zellkultursystem Aussagen über das Wachstumsverhalten von Zellen in der Umgebung von Biomaterialien machen. Dadurch können Tierversuche stark reduziert werden [Wilke et al. 1998].

## 4.2 Diskussion der Sterilisationsverfahren

### 4.2.1 Peressigsäure-Ethanol-Verfahren

Das Peressigsäure-Ethanol-Sterilisationsverfahren zählt zu den chemischen Verfahren.

Bezüglich der bakteriziden, fungiziden sowie der Viren und Sporen abtötenden Funktion der Peressigsäure, gibt es zahlreiche Daten [Koch et al. 1967; Pruss et al. 1999]. Durch Zugabe von Ethanol erreicht man eine bessere Penetration der Peressigsäure in die Knochen. Somit wird eine effektive Sterilisation gewährleistet.

Während Methoden wie Formaldehyd-Sterilisation den osteoinduktiven Effekt der Transplantate reduzieren [Munting et al. 1988] zeigt sich bei dem PES-Verfahren keine signifikante Verminderung der Osteoinduktivität [Haynert 1990; Thielicke et al. 1990]. Viele klinische Studien zeigen, dass PES keine Reduktion des osteoinduktiven Effekts verursacht und transplantierte demineralisierte Knochenmatrix ein gutes Einwachsverhalten aufweist [Kuhls et al. 2001]. Nach Angaben von Pruss et al. wurden in den vergangenen 20 Jahren über 60 000 allogene Gewebetransplantate mit dem PES-Verfahren sterilisiert und erfolgreich transplantiert. In allen Fällen wurden keine ernststen Nebenwirkungen, besonders Infektionsübertragung, beobachtet. Dies beruht sich auf eine retrospektive klinische Betrachtung der Jahre 1997 bis 2001. Dort zeigten sich bei über 90% der Patienten gute bis sehr gute klinische Ergebnisse. Lediglich in einigen Fällen wurde ein befriedigendes Ergebnis beschrieben. Des Weiteren fiel in dieser Studie eine gute bis sehr gute ossäre Integration des Transplantates, im Sinne einer neuen Knochenbildung, auf [Pruss et al. 2002]. Bezüglich der osteoinduktiven und der biomechanischen Eigenschaften der Transplantate nach PES-Behandlung zeigten Haynert 1990 und Thielicke et al. 1990, dass es keine signifikante Verringerung gibt [Haynert 1990; Thielicke et al. 1990].

Diese klinischen Daten können mit den experimentell ermittelten Daten ergänzt und teilweise bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten jedoch auch eine zusätzlich zelltoxische Wirkung der sterilisierten Knochentransplantate in Erwägung ziehen. Hierbei finden sich hohe Konzentrationen an LDH und Laktat, was für eine Zytotoxizität sprechen könnte. Dies muss kritisch betrachtet werden, da in vitro lediglich eine geringe Menge Medium zur Verfügung steht. Bei in vivo Bedingungen herrscht ein größeres Gesamtvolumen und Stoffwechselprodukte können besser abtransportiert werden. Zu diskutieren ist, ob es sich bei diesem Effekt um einen in vitro Effekt handelt. Diese würden sich mit den klinischen Daten von Pruss et al. decken, die ein gutes Knocheneinwachsverhalten der Transplantate in vivo beschrieben. Ähnliche Ergebnisse finden sich ebenfalls bei der zweiten Versuchsgruppe mit Tutobone®.

Licht- und elektronenmikroskopisch sowie histologisch finden sich im Verlauf extrazelluläre Matrizen (ECM) und es kommt zur Zellproliferation. Damit liefert das sterilisierte Knochenmaterial in vitro gute Voraussetzungen für eine Osteointegration.

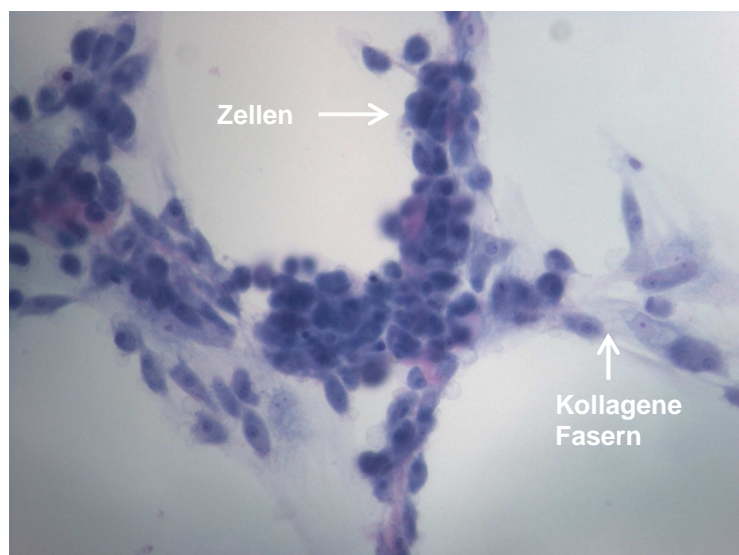


Abbildung 19 : Giemsa-Färbung nach 12 Wochen; PES-Verfahren; Well-Boden

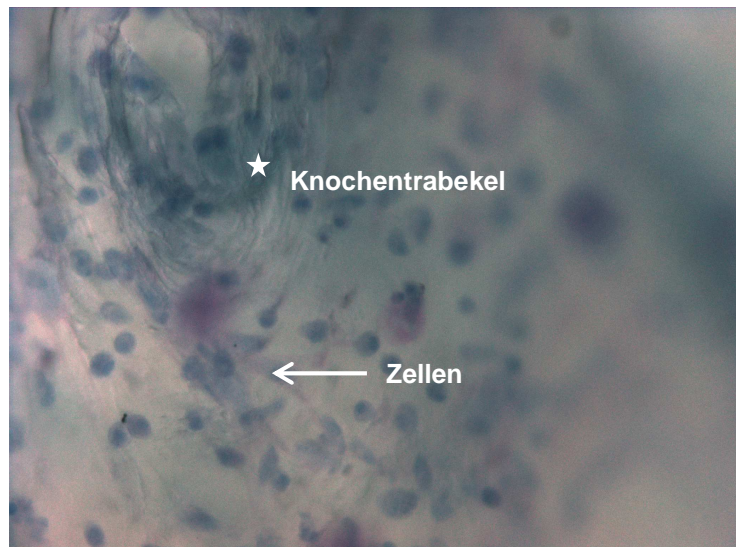


Abbildung 20: Giemsa-Färbung nach 12 Wochen; PES-Verfahren; Knochentrabekel

#### 4.2.2 Tutoplast®-Sterilisationsverfahren

Tutobone® sind bovine Knochen, die lösungsmittelkonserviert und mit Gammastrahlung sterilisiert wurden.

In diversen vorausgegangenen Studien wurde die Inaktivierung von Bakterien, Viren, Sporen und Pilzen bewiesen. Somit handelt es sich hierbei um ein gebräuchliches Verfahren zur Gewebesterilisation.

Bezüglich der Osteointegration zeigten sich gute Ergebnisse. Günther et al. stellten im Tierversuch mit Kaninchen heraus, dass es bezüglich der Integration des Knochentransplantates weder qualitative noch quantitative Unterschiede zwischen boviner, humaner und autologer Spongiosa bestehen. Durch Anlagerung neuen Knochens kommt es rasch zu einer Stabilisierung des Verbundes von avitalem Transplantat und Spongiosa. Die durch die Osteoklasten hervorgerufene Resorption führt zu einem vollständigem Remodelling nach vier bis acht Wochen. Nach einem halben Jahr sind nahezu keine avitalen Knochenreste nachweisbar. Der neu gebildete Knochen zeigt eine Struktur, die der ursprünglichen wieder entspricht [Gunther et al. 1998]. Bei diesem Verfahren wird die biomechanische Eigenschaft des Knochentransplantates weitestgehend nicht geschwächt. Eine mechanische Beeinträchtigung

der Stabilität der Transplantate wird durch hohe Dosen von Gamma-Strahlung hervorgerufen. Anderson et. al. sowie zahlreiche andere Autoren beschrieben, dass hohe Dosen an Gamma-Strahlung ( $>20\text{kGy}$ ) zu einer erheblichen mechanischen Schwächung des Transplantates führen. Damit erhöhte sich die Brüchigkeit dieses ursprünglich zur Stabilisierung verwendeten Materials [Anderson et al. 1992; Akkus et al. 2006]. Beim Tutoplast®-Verfahren wird eine schonende Prozedur zur Sterilisation verwendet. Es werden verschiedene Schritte wie Wasserentzug mit organischen Lösungsmitteln, Wasserstoffperoxid-Applikation und anschließende Gamma-Bestrahlung kombiniert. Die vorausgegangenen Prozesse ermöglichen eine niedrige Dosis der Gammastrahlen von  $17,8\text{ kGy}$ , da bereits zuvor schon relevante pathogene Keime einschließlich HIV und Hepatitis-Viren inaktiviert wurden. Die Bestrahlung dient lediglich der Abtötung unkonventioneller Keime. Eine gute biomechanische Eigenschaft ist eine wichtige Voraussetzung für ein Knochentransplantat, weil dieses im späteren Einsatz Stabilität gewährleisten muss. Das Tutoplast®-Verfahren entspricht diesen Voraussetzungen. In den experimentellen Studien zeigten sich diesbezüglich ebenfalls gute Eigenschaften. Somit stellt das Verfahren eine Alternative zu der autologen und allogenen Transplantation dar. Selbst der bovine Ursprung erlaubt gutes Einwachsverhalten in humanen Knochen.

Gambini et al. zeigten 1999 mittels MRT das Einwachsverhalten von allogenen Knochentransplantaten. Hierfür wurden humane Knochen verwendet. In der Kernspintomographie, maximal 13 Monaten nach Operation kam es bei über 85% der Patienten zu einer Heilung [Gambini et al. 1999]. Damit reiht sich dieses Ergebnis in die zahlreichen positiven Bewertungen des Tutoplast®-Verfahrens ein und befürwortet damit den klinischen Einsatz. Gute Integration des Transplantates zeigten Meyer et. al 2008 in einer in vivo Studie an insgesamt 9 Patienten. Sieben erhielten in Rahmen einer Osteotomie Tutobone®, zwei autologe Spongiosa. Nach 11 Monaten erfolgte die histologische Untersuchung von Knochenproben, die im Rahmen der Explantation des Metalls entnommen wurden. Dabei zeigte sich eine vollständige Resorption der autologen Spongiosa. Das xenogene Material war

zu 53% umgebaut, 47% von Tutobone® waren noch vorhanden. Stabilitätsdefizite, Infektion und Transplantatsinterung fand sich in dieser Studie nicht. Radiologisch war ebenfalls eine Osteointegration sichtbar. Alle Patienten waren mit dem Ergebnis zufrieden [Meyer et al. 2008].

Eine Studie von Trentz et. al. zeigt keine Unterschiede im in vitro Verhalten von allogenen, xenogenen und autologen Knochentransplantaten. In dieser Studie wurden Knochentransplantate mit einer Osteoblastenzellkultur inkubiert und knochenspezifische Marker bestimmt. Dies zeigte keine Zytotoxizität der Materialien auf die Osteoblastenproliferation. Des Weiteren stellten sie heraus, dass das Zellwachstum abhängig von der Oberflächenrauigkeit und Porosität ist. So begünstigt eine raue Oberfläche die Adhäsion von Makrophagen und größeren Zellen und damit die Differenzierung in Osteoklasten. Schließlich kommt es zur Knochenresorption. Remodelling durch Osteoklasten ist entscheidend für eine lange mechanische Stabilität und ist nur dann möglich, wenn die Entwicklung von Osteoklasten nicht verhindert wird [Trentz et al. 2003].

In Kombination mit den Ergebnissen dieser Studie liegt eine gute Biokompatibilität der Tutobone®-Transplantate vor. Dies zeigte sich zum einen darin, dass es im Verlauf zu einer zunehmenden Laktatproduktion als Zeichen der anaeroben Glykolyse kam. Dies ist mit einem zunehmenden Zellwachstum zu erklären, das durch die Mediummenge limitiert ist. Die Umgebungsbedingungen für die humanen Knochenmarksstammzellen stellten sich als gut dar. Durch die zunehmende Acidität im Verlauf des Versuches ist anzunehmen, dass es zur Aktivierung von Osteoklasten kam. Wie beschrieben sind diese Zellen für den Remodelling-Prozess von zentraler Bedeutung. Damit wird das Einwachsen des avitalen Knochentransplantates gewährleistet. In den elektronenmikroskopischen Bildern nach 12 Wochen sah man eine deutliche Zunahme der ECM. In weiteren Bildern mit Kossa und Giemsa-Färbungen finden sich Zellen und ECM an der Knochenoberfläche und zwischen den trabekulären Strukturen. Hier sieht man, dass das vorliegende Knochenmaterial

gute Wachstumsbedingungen liefert. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Studien.



Abbildung 21: Tutoplast®-Verfahren – 100 fache Vergrößerung



Abbildung 22: Tutoplast®-Verfahren - 400-fache Vergrößerung



## 4.3 Diskussion der Parameter

### 4.3.1 IL-6

IL-6 ist ein Zytokin, dass sowohl als Marker der Akuten-Phase-Reaktion und des Knochenstoffwechsels Bedeutung hat.

IL-6 liefert Aussagen über Entzündungsreaktion und Knochenstoffwechsel. Bei den beiden, auf verschiedene Art sterilisierten Knochenplättchen fand sich eine maximale Ausschüttung von IL-6 nach 28 Tagen. Zunächst kam es zum kontinuierlichen Anstieg, gefolgt von einem leichten Abfall. Danach blieb die Ausschüttung auf einem bestimmten Niveau bestehen.

In dieser Studie lag die IL-6- Ausschüttung bei den humanen Knochen, die nach dem PES-Verfahren sterilisiert wurden, signifikant am höchsten. In der Arbeitsgruppe zeigte sich zudem, dass der Goldstandard der autologen Knochentransplantate die weitaus größte IL-6-Produktion aufwies. Daher muss diskutiert werden, ob IL-6 als proinflammatorischer Marker allein zu werten ist. Van Snick zeigte, dass IL-6 vielfältige Funktionen aufweist. Es kann eine inflammatorische Reaktionen begünstigen oder auch hemmen und somit auf den Knochenstoffwechsel wirken [Van Snick 1990]. IL-6 wird lokal im Knochen durch Stimulation von IL-1 und TNF gebildet. IL-6 fördert die Osteoklastenreifung über deren Vorstufen, steigert die Anzahl von Osteoklasten in vivo und führt damit zu einer erhöhten Knochenresorption. Dies wurde von Kurihara et al bereits 1990 beschrieben [Kurihara et al. 1990]. Es gibt jüngere Daten, die zeigen, dass IL-6 auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. Viele Akute-Phase-Proteine, die in der Leber durch IL-6 induziert werden, weisen antientzündliche Funktionen auf [Tilg et al. 1994].

Balto et al. wollten in ihrer Studie nachweisen, ob IL-6 vor allem die intraossäre Knochendestruktion in vivo fördert oder hemmt. Dazu wurden Mäuse genetisch so manipuliert (Knock-out-Mäuse), dass diese nicht in der Lage waren IL-6 zu synthetisieren. Der Versuch zeigte, dass Interleukin-6 antiinflammatorische und antiresorptive Eigenschaften besitzt. Die Knochendestruktion korreliert mit einer erhöhten Ausschüttung von IL-1 und einer vermehrter Anzahl an Osteoklasten.

Fehlt, wie in dieser Studie gezeigt, IL-6, so kommt es zu einer übertriebenen entzündlichen Reaktion auf eine Infektion mit Anaerobiern aufgrund vermehrt sezernierter Zytokine und damit zur progressiven Knochendestruktion [Balto et al. 2001].

Wie oben beschrieben wurde IL-6 traditionell als proinflammatorisches Zytokin angesehen. Jüngere Daten zeigen jedoch, dass ihm viele typische proinflammatorische Eigenschaften fehlen und es zudem antiinflammatorische Funktionen besitzt. Zusätzlich trägt es indirekt zur Kollagensynthese bei [van de Loo et al. 1997]. Dieses Phänomen korreliert mit den lichtmikroskopischen Beobachtungen in dieser Studie, die kollagenen Strukturen zeigten. Um diese zu verifizieren bedarf es jedoch spezieller Untersuchungen.

1993 wurde durch Akira et al. demonstriert, dass bei Menschen durch Gabe von IL-6 Fieber und nicht typische Symptome wie Schock und DIC hervorgerufen werden. Dies findet sich jedoch bei proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF [Akira et al. 1993].

Weitere antiinflammatorische Eigenschaften von IL-6 sind die Hemmung der Lipopolysaccharid (LPS) - induzierten IL-1- und TNF-Produktion in Monozyten, Unterdrückung der Neutrophilenabwanderung und der TNF-Produktion, die durch LPS stimuliert werden. IL-6 verfügt zudem über einen endogenen negativen Feedback-Mechanismus, um eine zytokinvermittelte akute Entzündungsreaktionen zu hemmen [Fattori et al. 1994]. In dieser Studie ist die TNF- und IL-1 Produktion minimal, dies lässt sich mit der vermehrten IL-6-Ausschüttung erklären.

Auf den Knochenstoffwechsel wirken Zytokine ebenfalls. So zeigten Hofbauer et al. und Sakata et al. 1999, dass IL-1 und TNF- $\alpha$ , nicht aber IL-6, eine kontinuierliche Menge an Osteoprotegerinligand-mRNA stimulieren, die einen wichtigen Faktor für die Induktion der Osteoklastogenese darstellen [Hofbauer et al. 1999; Sakata et al. 1999].

Aufgrund der heutigen Datenlage, ist die Zuweisung der alleinigen proinflammatorischen, knochendestruierenden Eigenschaft von IL-6 kontrovers zu diskutieren. IL-6 spielt eine Rolle bei der Unterdrückung von akuten Entzündungsreaktionen und verhindert eine Knochenresorption. In dieser

Studie sah man eine signifikant höhere IL-6 Ausschüttungen in der Kultur von humanen mit Peressigsäure sterilisierten Knochen.

Mit dieser erhöhten Produktion sorgt IL-6 unter anderem für antiinflammatorische Zustände und hilft den Knochenanbau zu fördern. Im Vergleich der beiden Verfahren sieht man einen geringen Vorteil der humanen mit Peressigsäure sterilisierten Knochen gegenüber der bovinen nach dem Tutoplast®-Verfahren hergestellten Knochen. Beide zeigten bezüglich des Zytokinprofils ähnliche Eigenschaften.

Im Vergleich mit den IL-6-Werten in der Kultur ohne Knochenmaterial fällt auf, dass diese ebenfalls eine erhöhte Produktion aufwiesen. Generell fand sich stets eine geringere Produktion in der Gruppe der bovinen Knochen. Diese ist jedoch nur vereinzelt signifikant.

#### **4.3.2 TNF-alpha**

TNF-alpha gehört zu den Zytokinen mit inflammatorischen und osteolytischen Eigenschaften. Es steigert die Phagozytose und stellt einen Marker für Knochendestruktion dar.

Osteoklasten entstehen aus Vorläuferzellen der Reihe CFU-GM (colony-forming units granulocyte-macrophage). Dies geschieht über zwei Wege. Zum einen erfolgt die Stimulation über M-CSF (macrophage-colony stimulating factor), was über den Rezeptor c-Fms vermittelt wird. Zum anderen über die Anregung des Rezeptoraktivators NF- $\kappa$ B (RANKL) mit seinem Rezeptor RANK.

Kodama et al. und Dougall et al. zeigten, dass Mäuse, denen genetisch M-CSF oder RANKL fehlt, keine Osteoklasten bilden und sich eine Osteopetrose mit eingeschränktem Knochenabbau entwickelt [Kodama et al. 1991; Dougall et al. 1999].

Die Osteoklastogenese ist von der c-Fms und RANK-vermittelten intrazellulären Signalmolekül-Kaskade abhängig. Dies beinhaltet das Protein TRAF6 und die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- $\kappa$ B und NFAT [Franzoso et al. 1997; Kobayashi et al. 2001; Takayanagi et al. 2002].

RANKL alleine liefert nicht das finale Signal, aber es aktiviert Osteoklasten und fördert ihr Überleben. TNF-alpha fördert die RANKL-Produktion durch Stromazellen und induziert ihre Sekretion durch T-Zellen, B-Zellen und Endothelzellen, um die Osteoklastenbildung indirekt zu stimulieren [Hofbauer 1999]. TNF stimuliert ebenfalls die M-CSF Produktion von menschlichen Stromazellen, was wiederum die Osteoklastenbildung zur Folge hat [Srivastava et al. 2001]. Hohe Konzentrationen an TNF sind in der Lage auch direkt Osteoklastenvorläuferzellen zur Differenzierung anzuregen [Lam et al. 2000]. Goldring zeigte, dass chronische TNF-alpha Exposition in Mäusen zu einem entzündlichen Knochenverlust führt und sich eine erosive Arthritis entwickelt [Goldring 2000].

TNF ist gemeinsam mit M-CSF in der Lage, die Reifung von isolierten knochenmarksabstammenden Makrophagen in Osteoklasten zu fördern und diese Zellen dann zu aktivieren. Parathormon und Vitamin D3 üben ihren knochenresorptiven Effekt durch Stimulierung der RANKL-Expression aus [Kitazawa et al. 1999; Lee et al. 1999]. RANKL-produzierende Zellen sind mesenchymaler Herkunft und beinhalten Knochenmarkszellen und Osteoblasten.

Zytokine sind membranständige Proteine und üben ihren Differenzierungseffekt über direkte Interaktion von Stromazellen/Osteoblasten mit Osteoklastenvorläufer, die den RANK-Rezeptor exprimieren, aus [Lacey et al. 1998].

Harris und Redner et al. zeigten bereits, dass proinflammatorische Zytokine die Lockerung orthopädischer Implantate zu verantworten haben. Dies wird über eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen. [Harris 1995; Redlich et al. 2002].

TNF-alpha ist das dominierende Zytokin bei der inflammatorischen Osteolyse. Über seinen Rezeptor p55 fördert es die Osteoklastendifferenzierung in vitro und in vivo. Zudem ist es ein Hauptfaktor beim Knochenabbau mit lokaler Infektion, wie Parodontitis, die durch LPS induziert wird [Merkel et al. 1999].

In dieser Studie diente TNF- $\alpha$  als Marker für osteoklastischen Knochenabbau. Die höchsten Werte zeigten sich bei allen drei Gruppen, Tutobone®, PES und Kontrollgruppe, am ersten Tag. An den weiteren Tagen fand sich nahezu keine

Zytokinausschüttung. Die Kontrollgruppe wies dabei die höchste Ausschüttung auf, PES die geringste. In der statistischen Auswertung zeigt sich, dass die Gruppen nicht signifikant voneinander differieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im gesamten Versuchszeitraum keine vermehrte TNF-alpha Produktion nachweisbar ist.

Eine entzündliche Knochendestruktion innerhalb der 12 Wochen kann damit nicht verifiziert werden. Beide Verfahren weisen diesbezüglich die gleichen Eigenschaften auf. Osteoklastenaktivität ist für den Einbau von Knochen-  
transplantaten von zentraler Bedeutung. Fehlender Knochenabbau führt zum Verbleiben des Transplantates und damit zu keiner Osteointegration. Damit wird die mechanische Stabilität geschwächt. Für eine exakte Aussage bezüglich der Qualität eines Verfahrens muss jedoch das Gesamtbild betrachtet werden.

#### **4.3.3 IL-1 $\beta$**

IL-1beta zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und stellt einen Mediator der Akute-Phase-Reaktion dar. Zusätzlich aktiviert es Osteoklasten. Bei entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, kommt es zu Zerstörung von Knorpel und Erosionen des darunter befindlichen Knochens. Bei solchen Prozessen sind proinflammatorische Zytokine wie TNF und IL-1 in der Umgebung erhöht [van den Berg 1999].

Gesteigerte IL-1 Produktion findet man ebenfalls postmenopausal. Sie ist mit Osteoporose assoziiert. Kitazawa et al. zeigten, dass die Antagonisierung von IL-1 und TNF zu einer Reduktion der Knochenresorption in vitro führt [Kitazawa et al. 1994].

Kawashima et al. beschrieben, dass proinflammatorische Th1- und antiinflammatorische Th2-Zytokine durch eine Pulpainfektion induziert werden und in der Lage sind, die IL-1-Ausschüttung und Makrophagenaktivität zu modulieren [Kawashima et al. 1999].

Knochenresorptive Zytokine wie TNF und IL-1 steigen über vier Wochen nach Infektion linear an. Dagegen werden antiinflammatorische Th2-Zytokine zwei

Wochen nach Infektionsbeginn vermehrt ausgeschüttet und fallen danach ab. Makrophagen finden sich in der frühen Infektion, wie von Kawashima et al. für die Pulpainfektion beschrieben. Diese Makrophagen sezernieren IL-12 und IL-18 sowie auch IL-1 und TNF-alpha.

IL-1-Injektion bei Menschen ruft Fieber, Kopfschmerz, Myalgien und Arthralgien hervor. Es induziert die Genexpression von Typ II Phospholipase A<sub>2</sub> und COX-2, was wiederum zur vermehrten ProstaglandinE<sub>2</sub>-Produktion führt [Dinarello 2000].

In dieser Studie zeigten sich zu Beginn, innerhalb der ersten Woche erhöhte Werte von IL-1beta. Danach fand keine wesentliche Produktion mehr statt. In der reinen Zellkultur ohne Knochen lag die höchste Konzentration vor, gefolgt von PES und Tutobone®, wobei es lediglich einen einzigen signifikanten Unterschied zwischen Tutobone® und PES, mit einer vermehrten Ausschüttung bei PES, gab. Anzunehmen ist, dass es aufgrund der Stresssituation der Zellen zu einer erhöhten Produktion von IL-1beta kam. Nach Adaptation an die Umgebung sistierte dann die Ausschüttung des Zytokins. Zu diskutieren ist eine zu Beginn erfolgte kurze inflammatorische Reaktion, die sich dann selbst limitierte. Vor allem Zellen und PES zeigten diese Reaktion.

Eine weitere Überlegung wäre, dass bereits Makrophagen in den Knochenmarkszellen vorhanden waren und in der Kultur dann die Synthese von IL-1 fortgesetzt wurde. Danach wäre ein eventueller Zelltod als Erklärung der sistierenden Produktion zu diskutieren.

Zusammenfassend zeigten sich keine wesentliche Makrophagenaktivität und die damit verbundenen Knochenresorption.

#### **4.3.4 IFN-γ**

IFN-gamma ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin und spielt eine Rolle bei der entzündlichen Knochendestruktion. Dieses Zytokin wird innerhalb von vier Wochen nach Infektionsbeginn von Th1-Zellen vermehrt produziert. Das

von den Makrophagen ausgeschüttete Zytokin IL-12 induziert die Th1-Zell-Differenzierung aus nativen T-Zellen und ihre spätere IFN-gamma-Produktion [Kohno et al. 1997]. Außerdem bewirken IL-12 und IL-18 die IFN-gamma Produktion in NK-Zellen [Okamura et al. 1998].

IFN-gamma aktiviert Makrophagen und induziert IL-1 und NO Synthese [Pellat et al. 1990].

Jüngere Studien berichten jedoch, dass die ursprüngliche Hypothese IFN-gamma besitze knochenresorptive Eigenschaften, nicht eindeutig zutrifft. Sasaki et. al. zeigten 2004, dass Knock-out Mäuse von IL-12, IL-18 und IFN-gamma nicht wesentlich zur Reduktion der Knochenresorption in Vergleich zum Wildtyp beigetragen haben [Sasaki et al. 2004]. Somit bestehen Unklarheiten bezüglich der Funktion von IFN-gamma.

Tatsächlich verfügt dieses Zytokin zu gleichen Anteilen über beide Eigenschaften. IFN-gamma blockiert die Osteoklastenbildung indem es direkt auf deren Vorstufen einwirkt. Zudem stimuliert es die Osteoklastenbildung durch vermehrte Antigenpräsentation. In experimentellen Studien zeigte sich, dass RANKL die Differenzierung von Makrophagen in Osteoklasten stimuliert und IFN-gamma dosisabhängig die Osteoklastenbildung hemmt. Dieser Effekt ist bei höheren Konzentrationen gegeben [Takayanagi et al. 2000].

Gao et al. zeigten zudem, dass IFN-gamma die Expression von MHC II Molekülen induziert und Antigenpräsentation in Makrophagen fördert. Zudem bewirkt es die Sezernierung von osteoklastenbildenden Faktoren durch T-Zellen. Insgesamt unterdrückt IFN-gamma die Osteoklastenbildung durch direkte Suppression der Differenzierung von Makrophagen in Osteoklasten. Jedoch indirekt stimuliert es die Osteoklastenbildung durch Anregung der Antigenpräsentation. Damit neutralisiert sich der indirekte Osteoklastenbildungseffekt mit dem direkten Anti-Osteoklastenbildungseffekt [Gao et al. 2007].

In dieser Studie fand sich eine geringe Interferon-Ausschüttung. Die höchste Konzentration war nach 14 Tagen zu messen. Diese war jedoch sehr gering und lag fast unter der Nachweisgrenze. Zusätzlich gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Verfahren und der Kontrollgruppe.

Dieses Ergebnis zu interpretieren liefert Probleme, da IFN sowohl osteoklastenaktivierende und –inhibierende Eigenschaften besitzt. Aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen, überwiegt hier eher der knochenresorptive Charakter. Dies gilt jedoch nur begrenzt für den Zeitraum zwischen Tag 12 und 18. Danach fand sich nahezu keine Ausschüttung. Somit kommt es dann in Anlehnung der oben beschriebenen Eigenschaften weder zur Osteoklastenaktivierung- oder hemmung. Zu diskutieren ist auch, ob sich zu den späteren Zeitpunkten überhaupt Makrophagen in der Zellkultur befinden. Dies würde mit den Ergebnissen der IL-1beta-und TNF-Produktion korrelieren.

Zusammenfassend muss in Hinblick auf die osteoklastenaktivierenden Zytokine davon ausgegangen werden, dass es hierbei in dem Versuchszeitraum nicht zu Knochenresorption gekommen ist.

#### **4.3.5 Lactat und pH**

Zur Frakturheilung ist die Bildung neuer Blutgefäße von Bedeutung. Eine unzureichende angiogenetische Antwort hemmt die ossäre Regeneration und trägt zu Osteomyelitis und Osteonekrose bei [Friedman 1990]. An der Frakturseite werden von aktivierten Entzündungszellen Wachstumsfaktoren für Endothelzellen, wie PDGF (platelet-derived growth factor) und FGF-2 (fibroblast growth factor 2), ausgeschüttet. Andere Zytokine, wie TGF- $\beta_1$ , die das Verhalten der Zellen modulieren können, sind mehrfach in der extrazellulären Matrix des Knochens vorhanden, [Bolander 1992] Osteoblasten sezernieren einen wichtigen Faktor für die Angiogenese, VEGF. Hypoxie führt zur vermehrten VEGF-Ausschüttung [Steinbrech et al. 2000].

Die Umgebung der Fraktur ist azidotisch und mit erhöhten Laktat-Spiegeln assoziiert [Chakkalakal et al. 1994]. Dies entsteht durch Gefäßruptur und daraus resultierender Ischämie mit der Folge einer vermehrten anaeroben Energiegewinnung [Swenson O and Clasff CL 1946].

Spector et al. zeigten, dass die Umgebungssituation ausschlaggebender Faktor für die VEGF-Sekretion ist [Spector et al. 2001].



Bei einer Fraktur findet man in der Umgebung des Knochenkallus, aufgrund der dortigen unterbrochenen Blutzufuhr, abfallende pH-Werte und vermehrt Laktat. Zu den wichtigsten biologischen Effekten von VEGF zählen die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und die Förderung der Produktion von Enzymen, die in der Lage sind, für neue Gefäßeinsprossung zu sorgen. VEGF begünstigt außerdem eine steigende Ausschüttung von Molekülen, die eine Adhäsion von Entzündungszellen an das Endothel ermöglichen [Ferrara et al. 1997]. Diese Effekte werden durch weitere synergistische Interaktionen mit anderen angiogenetischen und nonangiogenetischen Zytokinen unterstützt.

Spector et al. demonstrierten, dass hohe Laktatkonzentrationen eine signifikante Reduktion der VEGF-Produktion, sowohl bei neutralem pH von 7,4 und unter leicht saueren Bedingungen mit einem pH von 7,0, hervorrufen [Spector et al. 2001]. Die Osteoblasten selbst reagieren jedoch auf die Wundverhältnisse nicht mit zunehmendem Gefäßeinwachstum. Diese Rolle wird von anderen Zellen, wie Wundmakrophagen, die sich in der Fraktumgebung befinden, übernommen. Diese haben gezeigt, dass sie als Antwort auf steigende Laktatkonzentration die Angiogenese steigern [Jensen et al. 1986]. Diese Ergebnisse decken sich gut mit denen von Krieger et al. Sie beschrieben eine gesteigerte Osteoklastenaktivität bei niedrigen pH-Werten [Krieger et al. 1992]. Zusammenfassend berichteten Spector et al. über die Ergebnisse ihrer Studie, dass in der Umgebung einer Fraktur die Fähigkeit der Osteoblasten neue Blutversorgung zu bilden, aufgrund der dortigen Stresssituation, vermindert ist. Prinzipiell bewirkt eine kurze Dauer der Hypoxie als Folge einer Fraktur eine vermehrte VEGF-Produktion der Osteoblasten. Bleibt dieser hypoxische Zustand jedoch bestehen und kommt es somit zum anaeroben Stoffwechsel mit der Bildung von Laktat und  $H^+$ -Ionen, vermindert sich die VEGF-Expression der Osteoblasten.

In einer Studie von Kaysinger und Ramp wurde der Einfluss des extrazellulären pH-Wertes auf humane Osteoblasten untersucht. Die Kollagensynthese und die AP-Aktivität steigen mit zunehmendem pH-Wert. Dieser Bereich liegt jedoch zwischen pH 7,0 und 7,6. Bei pH 7,8 nimmt dieser Effekt wieder ab. Damit zeigt

sich, dass bei höheren pH-Werten die Osteoblastenaktivität abnimmt [Kaysinger et al. 1998].

In dieser Studie korrelierten Laktatproduktion und pH-Wert-Erniedrigungen miteinander. Zu Beginn lagen die pH-Werte im neutralen Bereich. Im Verlauf fand sich an Tag 18 ein maximaler Anstieg auf ca. 7,75. Bis zu diesem Zeitpunkt kam es parallel zu einem Laktat-Anstieg, der sich jedoch bis zum Tag 28 fortsetzte und dann ein Plateau erreichte. In den ersten 18 Tagen kann man davon ausgehen, dass es aufgrund der Umgebungssituation zur Bildung von Angiogenesefaktoren kam. Osteoblasten, vorausgesetzt die Differenzierung ist erfolgt, wären damit in der Lage VEGF zu produzieren und die Gefäßneubildung zu initiieren. Die Osteoklastenaktivität wurde bis zu diesem Zeitpunkt begrenzt. Für alle drei Gruppen, Kontrolle, PES und Tutobone® fanden sich ähnliche Werte. Damit kann man für die ersten Wochen keine Aussage treffen, welches Verfahren die bessere Biokompatibilität besitzt. Im Verlauf, nach Tag 18, kam es zu einem kontinuierlichen Abfall des pH-Wertes bis zu Tag 60, gefolgt von einem erneuten Anstieg. Parallel erreichten wir ein Maximum der Laktatkonzentration. Dies korrelierte mit der zunehmenden Azidität. Folglich wurden in dieser Studie die Umgebungsbedingungen für die Osteoblasten besser, da ihre Aktivität bei pH-Werten zwischen 7,0 und 7,6 vermehrt ist. Anzunehmen, wie bereits in zahlreichen Studien belegt, ist eine folglich gesteigerte Osteoklastenaktivität und verminderte VEGF-Produktion mit reduzierter Angiogenese durch erhöhte Laktatwerte. Dies lässt sich jedoch nur vermuten, da Zytokine wie TNF und IL-1, die von Osteoklasten sezerniert werden nicht nachweisbar waren und damit die Osteoklastenaktivität fraglich ist. Die Beurteilung der Ergebnisse im Zusammenhang mit den Studien ist sehr komplex. Niedrige pH-Werte stellen eine schlechte Umgebungssituation für die Frakturheilung dar. Davon sind vor allem Werte im leicht sauren Bereich, unter 7,0 betroffen. Ideale Werte, wie sie im menschlichen Körper vorliegen, liegen zwischen 7,38 und 7,42. In diesem Bereich sind die Osteoblasten am aktivsten. Es kommt zur Kollagenproduktion und AP-Ausschüttung. In dieser Studie wären die vorliegenden pH-Werte eine ideale Umgebungssituation für Osteoblasten,

dennoch fehlte die AP-Produktion. Die Ursache dafür könnte sein, dass die vorliegenden hypoxischen Bedingungen, wie sie in unserer Zellkultur vorliegen, die Osteoblastendifferenzierung hemmen. Es werden auch kaum Angiogenesefaktoren gebildet, die für die Frakturheilung wichtig wären. Zudem handelte es sich hierbei um in vitro Bedingungen und der Abtransport verschiedener Stoffwechselprodukte über das Gefäßsystem war nicht möglich. Insgesamt sind die anaerobe Glykolyse und die vermehrte Laktatproduktion für die Osteoblastenreifung nicht ideal.

Damit stellt diese Situation in vitro schlechtere Bedingungen für die Frakturheilung und den Einbau des Knochentransplantates dar.

Zum Zeitpunkt der vermehrten Laktat- und  $H^+$ -Produktion handelte es sich auch nicht mehr um den zu Beginn notwendigen Zustand der Hypoxie, indem vermehrte Osteoblastenaktivität zu beobachten ist. Dort war es bereits zum gesteigerten anaeroben Stoffwechsel mit vermehrter Produktion saurer Valenzen gekommen. Im Verlauf ist dieser Effekt jedoch nicht alleinig auf die Zellkultur zurückzuführen, wo die Vermutung nahe liegt, dass die in vitro Bedingungen nicht eins zu eins auf die in vivo Situation übertragen werden können. Man erkennt hier deutlich, dass die pH-Werte der Zellen stets signifikant höher lagen als die der Kulturen mit Knochenmaterial.

Deutlich wird dieser Unterschied auch in der Laktatproduktion. Dabei fand sich zu Beginn eine signifikant höhere Laktatsynthese der PES-haltigen Medien.

Die Laktatproduktion korrelierte mit der Zunahme des anaeroben Stoffwechsels. Eine erhöhte Laktatproduktion spricht daher für vermehrte Zellaktivität und damit Wachstum. Hier kann man von einer guten Proliferation durch biokompatible Umgebungsbedingungen ausgehen. Aufgrund dessen kam es zum anaeroben Stoffwechsel und vermehrter Laktat- und  $H^+$ -Produktion. Dies führte wiederum zur Anregung der Osteoklastenaktivität. Diese ist von essentieller Bedeutung für den Remodelling-Prozess und damit für die Integration des Knochentransplantates. Bezüglich der pH-Werte müsste man darauf schließen, dass die Laktatproduktion der Tutobone®-Kultur höher ist, diese aber den geringsten pH-Wert aufweist. Jedoch fand sich in der Kultur mit PES sterilisierten Knochen die größte Laktatkonzentration. Spector et. al.

zeigten diesbezüglich in ihren Versuchen, dass der pH-Wert eine untergeordnete Rolle spielt bezüglich der VEGF-Produktion der Zellen. Entscheidend dafür ist die Laktatkonzentration [Spector et al.].

Bezüglich der Umgebungssituation lässt sich hierbei keine Aussage machen, welches Knochenmaterial die bessere Biokompatibilität aufweist. Ein längerer Beobachtungszeitraum könnte vielleicht dazu beitragen dies besser zu differenzieren.

Hinsichtlich des gesteigerten Stoffwechsels und der damit verbundenen Zellproliferation kann man bei beiden Materialien von osteoinduktiven Eigenschaften ausgehen.

#### **4.3.6 Laktatdehydrogenase**

Die Laktatdehydrogenase diene als Marker für Zelltod. Im 12-Wochen-Versuch fand sich ein kontinuierlicher Anstieg der LDH-Ausschüttung. Zunächst erreichte die Konzentration an Tag 36 ein Maximum, fällt dann im Verlauf ab. Dabei zeigte sich konstant eine signifikant niedrigere Konzentration in der Kontrollgruppe. Die größte LDH-Produktion fand sich bei der PES-Kultur mit einem Maximum an Tag 36 und gegen Ende des Versuchs mit erneuter Zunahme. Der Unterschied zur Tutobone®-Kultur war in der ersten Woche und in den letzten zwei Wochen signifikant größer. Das spricht für vermehrten Zelltod in diesen Zeiträumen.

Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass es sich hierbei um ein in vitro Geschehen handelt. Dort lebten die Zellen mit einer bestimmten Menge an Medium. Zunehmende Zellzahlen sind mit einem erhöhten Nährstoffbedarf über den Versuchszeitraum assoziiert. Als Reaktion des verminderten Nährstoffangebotes und der zunehmenden Azidität durch anaeroben Stoffwechsel kommt es zum Zelltod. Zu diskutieren wäre, ob ein täglicher Wechsel des Mediums dies eventuell hätte verhindern können. Jedoch sollte aufgrund der erzielten Ergebnisse eine Zytotoxizität der Transplantate in Erwägung gezogen werden. Dem entgegen zu setzen ist, dass es zu einem

langsamen Anstieg der LDH-Konzentration kam. Bei einem zytotoxischen Effekt des Transplantates würde man eher eine zu Beginn erhöhte LDH-Konzentration vorfinden. Denn ein Kontakt des potentiellen toxischen Materials mit einer Zellkultur, würde direkt zu deren Tod führen. Nach mehreren Wochen sind eventuelle toxische Metabolite ausgewaschen und im Rahmen des Mediumwechsels entfernt worden. Daher scheint die erste Annahme als Ursache zu zutreffen.

Anzunehmen ist, dass es in vivo durch das größere Nährstoffangebot und den besseren Abtransport von verbrauchten Substanzen über das Gefäßsystem, nicht in diesem Ausmaß zum Zelltod kommen würde. Darin besteht möglicherweise ein Ansatz für weitere Studien um dies weiter zu differenzieren, eventuell in einem Tierversuchsmodell.

#### **4.3.7 Alkalische Phosphatase**

In unserer Kultur, die vor allem auf Inflammation ausgerichtet war, wurde zusätzlich die Alkalische Phosphatase als Marker für Osteoblastenaktivität bestimmt. Sie wird in den Knochen vermehrt exprimiert, da sie dort in den Mineralisierungsprozess involviert ist [Whyte 1994]. Zu den knochen-spezifischen Funktionen zählen die Erhöhung der lokalen Konzentration von anorganischem Phosphat und Transport von Phosphat. Des Weiteren agiert das Enzym als Calcium-bindendes Protein oder  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. In vitro produzieren proliferierende Osteoblasten extrazelluläre Matrix von Fibronectin und Typ I Kollagen, aber nur geringe Mengen an AP. Im Verlauf kommt es zu vermehrten AP-Aktivität mit der Folge der Mineralisation [Owen et al. 1990].

In dieser Studie waren die AP-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze. Damit lässt sich in dem Zeitraum von 12 Wochen keine Mineralisation enzymatisch nachweisen. Im Knochenstoffwechsel wird zunächst ECM produziert. Währenddessen ist die AP-Produktion minimal. Mikroskopisch fand man im Verlauf zunehmende ECM-Bildung. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in unserem Versuchszeitraum noch die Kollagen und ECM-

Produktion im Vordergrund standen. Der Knochenanbau durch Osteoblasten erfolgt eventuell zu einem späteren Zeitpunkt. Dort könnte dann auch AP in höheren Konzentrationen nachweisbar sein. Für weitere Studien ist eventuell ein längerer Zeitraum anzustreben.

Eine Erklärung für die verminderte AP-Produktion könnte, in Kombination mit den anderen Daten, das verminderte Nährstoffangebot sein. Dadurch differenzieren sich die Zellen langsamer aus und es kommt zur verminderten Osteoblastendifferenzierung. Ein Durchflussmodell könnte als zukünftiger Versuchsansatz dienen.

Die Beobachtung, dass es zu keiner oder extrem geringen AP-Aktivität im Zellkulturmodell kommt, machten Hofmann et al. bereits im Jahr 2000. Diese untersuchten verschiedene Knochentransplantate, die unter anderem auch nach dem Tutoplast®-Verfahren sterilisiert worden waren. Dazu wurde eine Osteoblastenzellkultur verwendet. Es ließ sich über den gesamten Versuchszeitraum Osteokalzin, was ebenfalls von Osteoblasten produziert wird, jedoch nicht Alkalische Phosphatase nachweisen [Hofmann et al. 2000]. Da in dieser Arbeit Osteokalzin nicht als Marker bestimmt wurde, lassen sich über dieses Phänomen aktuell keine Aussagen treffen. In weiteren folgenden Studien könnte man anstelle der AP-Konzentration die Osteokalzinproduktion messen und gegebenenfalls genauere Aussagen bezüglich der Osteoblastenaktivität machen.

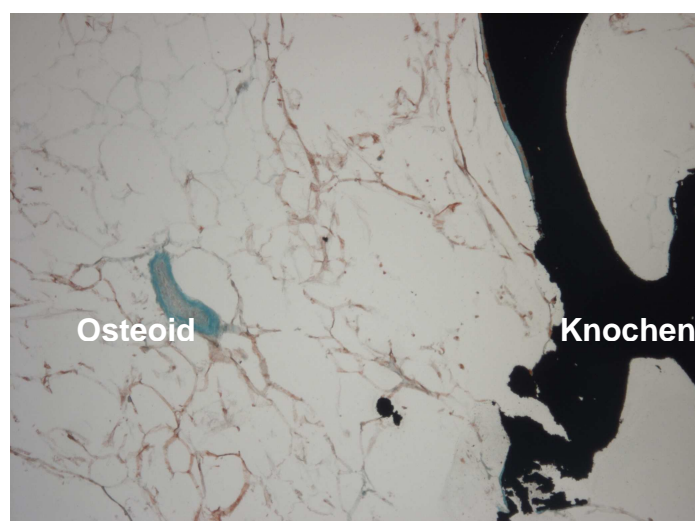


Abbildung 23: PES-Verfahren – 100-fache Vergrößerung

#### **4.3.8 Zellzahl**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte zur eigenen Kontrolle, damit Zellen nicht übermäßig abgenommen wurden. Es zeigte sich im gesamten Versuchszeitraum, dass die Zellzahl, die bei dem Mediumwechsel abgenommen wurde, bei allen Gruppen ähnlich war. Somit können unterschiedliche Zellzahlen als mögliche Ursache von differierenden Zytokinmengen ausgeschlossen werden.

#### **4.3.9 Vergleich mit physiologischer Frakturheilung**

Idealerweise würden die Knochentransplantate so in den Knochen integriert werden, wie man es bei der physiologischen Frakturheilung vorfindet. Ohne eine entzündliche Reaktion würden Knochen nicht heilen.

Diese Studie befasst sich mit der Zytokinausschüttung und den damit verbundenen Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel. Einhorn zeigte 1998 im Rattenmodell, die verschiedenen Phasen der Frakturheilung.

Während der physiologischen Knochenheilung kommt es anfangs zu einer Entzündungsreaktion [Einhorn 1998]. In dieser Phase finden sich Makrophagen und andere Entzündungszellen in der Umgebung der Fraktur und produzieren IL-1 und IL-6 [Einhorn et al. 1995]. Diese, sowie weitere Zytokine, erhöhen die Synthese der extrazellulären Matrix, stimulieren die Angiogenese und rekrutieren endogene fibrogenetische Zellen an der Verletzungsseite [Feghali et al. 1997].

In dieser Studie fanden sich zu Beginn nahezu die gleichen Bedingungen wie in vivo. IL-1 und IL-6 zeigten ihre maximale Ausschüttung an Tag 1 wie man sie bei der physiologischen Frakturheilung findet. Dabei spielen Makrophagen eine zentrale Rolle. Man kann annehmen, dass sich an Tag 1 nach Studienbeginn schon Makrophagen in der Kultur befanden. Es wird so eine Voraussetzung zur Bildung extrazellulärer Matrizen geschaffen.

IL-1 und TNF- $\alpha$  sind wichtige Zytokine im Knochen-Remodelling-Prozess und der Hämostase. Sie regulieren die Osteoklastenaktivität durch Stimulation der hämatopoetischen Vorläuferzellen sich in Osteoklasten zu differenzieren oder direkt durch Anregung der Osteoklasten ihre resorptive Eigenschaft zu erhöhen [Stashenko et al. 1987].

TNF- $\alpha$  trägt seinen Teil zur zellulären Antwort auf ein Trauma bei, indem es Akute-Phase-Proteine induziert und die Adhärenz von Leukozyten auf Endothelzellen erhöht [Wallach et al. 1999].

IL-1 wird in der gesamten Phase der Frakturheilung in sehr geringer Menge gebildet. Es kommt jedoch nach LPS-Stimulation in der frühen Entzündungsphase (Tag 3) zu hoher Aktivität [Einhorn et al. 1995]. Diese Beobachtung lässt sich in dieser in-vitro-Studie ebenfalls machen. Nach 48 Stunden zeigte sich die maximale IL-1 $\beta$ -Produktion.

Die IL-6-Ausschüttung ist besonders hoch in der frühen Phase der Frakturheilung [Einhorn et al. 1995]. In unserer Studie fand sich in Anlehnung daran zu Beginn ebenfalls eine hohe IL-6-Konzentration, diese zeigte sich auch noch im weiteren Versuchszeitraum.

In einer Arbeit von Kon et al. fand sich im Rattenmodell eine vermehrte TNF- $\alpha$ - und IL-1-Produktion innerhalb von 24 Stunden nach Fraktur. Sie war verbunden mit einem großen Zustrom von Immunzellen an der Frakturseite [Kon et al. 2001].

Dass IL-1 und TNF- $\alpha$  auch an Tag 21 und 28 nach Fraktur vermehrt synthetisiert werden, beschrieben Aizawa et al. 2000. Diese zwei Zytokine haben zu Beginn während des Knochenremodelling und im Verlauf in der Knochenheilungsphase eine wichtige Funktion [Aizawa et al. 2001].

Die Beobachtungen, dass TNF- $\alpha$  und IL-1 über die gesamte Zeit der Frakturheilung von Bedeutung sind, konnte in unserer Studie nicht gezeigt werden. Dort zeigte sich lediglich eine Synthese innerhalb der ersten 48 Stunden.

In dieser Arbeit lässt sich der physiologische Prozess der Frakturheilung nur zu Beginn nachvollziehen. Später differieren die Zytokinkonzentrationen von der in vitro Analyse und den in vivo Verhältnissen.



#### 4.4 Zusammenfassende Beurteilung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass beide Sterilisationsverfahren proinflammatorische Reaktionen in Hinblick auf die Zytokinproduktion hervorrufen. Dabei handelt es sich um eine kontrollierte Reaktion wie man sie auch bei der physiologischen Frakturheilung findet. Es kommt nicht zu einer überschießenden Reaktion.

Im gesamten Versuchszeitraum kommt es zu Zellwachstum. Dies wird durch eine zunehmende Laktatproduktion als Zeichen vermehrter Stoffwechselaktivität verdeutlicht, damit Zellproliferation und –differenzierung erfolgen können. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lagen die Laktatkonzentrationen der Kulturen mit Knochenmaterial höher.

In der Licht - und Elektronenmikroskopie fanden sich kollagene Strukturen und differenzierte Zellen. Zu Beginn sind lediglich undifferenzierte Rundzellen in der Kultur nachweisbar.

Osteoblastenaktivität war im Versuchszeitraum enzymatisch mittels der Alkalischen Phosphatase nicht nachweisbar, man findet jedoch bereits ECM und kollagene Strukturen. Dies würde für Osteoblastenaktivität sprechen.

Eine zytotoxische Eigenschaft der Materialien bestand nicht, denn die LDH-Konzentration als Marker hierfür war zu Beginn gering. Diese Ergebnisse findet man bereits in vorangegangenen Studien.

Beide Verfahren sind validiert und werden seit vielen Jahren als Knochentransplantat eingesetzt. Nach dem neuen Gewebegesetz sind dies zwei Verfahren, die auch in Zukunft weiter Bestand haben werden. Sie werden bereits von eigenen Firmen produziert.

Der Zellkulturversuch ist jedoch nur ein orientierender Ansatz. Die Bedingungen sind an den menschlichen Organismus angepasst, sie können jedoch die in vivo Situation nicht 100%ig nachahmen. Es fehlt der ständige Austausch des Mediums wie man ihn im menschlichen Körper vorfindet. Somit entstehen Produkte wie Laktat und  $H^+$ -Ionen, die sonst nur in geringerer Anzahl vorzufinden sind.

Insgesamt lieferte diese Studie eine orientierende Aussage bezüglich der proinflammatorischen Reaktion von allopathen und xenopathen Knochenersatzmaterialien, die in weiteren Arbeiten vervollständigt werden können. Tierversuche könnten hierbei weitere Antworten geben. Auch Studien, in denen Patienten nach Knochen transplantation retrospektiv über einen gewissen Zeitraum beobachtet werden, wären eine Möglichkeit. Gute Informationen liefern auch moderne bildgebende Verfahren wie die MRT oder CT.

Für diese Studie kann die Aussage getroffen werden, dass xenogene Knochen transplantation eine Alternative zu allopathen darstellen, denn beide verfügen über ähnliche Eigenschaften im Zellkulturversuch.

## 5 Zusammenfassung

In der Orthopädie, Mund-Kiefer-Gesichts, Trauma- und Tumorchirurgie werden seit vielen Jahren Knochentransplantationen vorgenommen. Dazu verwendet man autologe, allogene, und xenogene Transplantate sowie synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien. In Knochenbanken werden allogene Transplantate aufbewahrt. Damit Übertragungen von Infektionen vermieden werden, gibt es zahlreiche Sterilisationsarten. Dazu zählen chemische, thermische und solche durch Gammastrahlung sowie Kombinationsverfahren.

In der Vergangenheit beobachtete man, dass es nach Knochentransplantationen zu schlechter Osteointegration, Refraktur und Infektion gekommen war. Diese Studie vergleicht zwei Sterilisationsverfahren im Hinblick auf die proinflammatorische Reaktion mit der Frage, ob bovine Knochen eine Alternative zu allogenen Transplantaten darstellen. Humane Knochen wurden mit dem Peressigsäure-Ethanol-Verfahren und bovine Knochen mit dem Tutoplast® - Verfahren sterilisiert. Beide zeigten in vorangegangenen Studien, dass sie eine gute Osteointegration aufweisen.

In einem Zellkulturversuch mit humanen Knochenmarkszellen wurden die sterilisierten Knochenplättchen über 12 Wochen beobachtet. Die Knochenmarksstammzellen sind im Rahmen einer Endoprothetik angefallen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden.

Zytokine, die Osteoklastenaktivität begünstigen und proinflammatorische Reaktionen hervorrufen, wurden über den gesamten Versuchszeitraum bestimmt. Dazu zählten TNF-alpha, IFN-gamma IL-1beta und IL-6.

Zum anderen erfolgte die Messung von pH-Wert, LDH-, Laktat- und AP-Produktion. Diese liefern Aussage über Umgebungsbedingung, Zytotoxizität und Osteoblastenaktivität in der Zellkultur.

Anhand des Zytokinprofils zeigte sich, dass IL-6 vermehrt in der Kultur mit den PES-sterilisierten Knochen im Vergleich zu den bovinen synthetisiert wurde. Bei beiden Verfahren fand sich ein kontinuierlicher Anstieg der Konzentration über Wochen, welche dann auf einem Niveau bestehen blieb.

TNF-alpha als Marker für inflammatorischen Knochenabbau konnte lediglich nach 48 Stunden nachgewiesen werden. Dabei unterschieden sich die beiden Verfahren nicht signifikant voneinander. Die IFN-gamma-Produktion war ebenfalls im gesamten Versuchszeitraum nur gering nachweisbar. Hierbei gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Zu Beginn des Versuchs wurde als weiterer Marker für Osteoklastenaktivität IL-1beta synthetisiert. Im Verlauf sistierte jedoch die Produktion dieses Zytokins. Dabei fand sich vor allem bei PES-sterilisiertem Knochen diese Reaktion.

Im Vergleich zur physiologischen Frakturheilung decken sich die Ergebnisse im Zytokinprofil nur zu Beginn des Versuches.

Die Umgebungsbedingungen für die Knochenmarkszellen wurden im Verlauf schlechter. Es kam zur zunehmender Laktatproduktion, pH-Wert-Abfall und vermehrter LDH-Konzentration. Anzunehmen ist, dass dies durch die in vitro Bedingungen mit einem verminderten Nährstoffangebot entstanden ist. Eine Zytotoxizität der Transplantate ist nicht wahrscheinlich, da es erst im Verlauf zu einer erhöhten Produktion gekommen war. Osteoblastenaktivität und die damit verbundenen AP-Produktion fanden sich nicht. Es zeigten sich lichtmikroskopisch kollagene Strukturen und ECM, die jedoch auf Osteoblastenaktivität schließen lassen.

In der licht- und rasterelektronenmikroskopischen Betrachtung der Knochen fanden sich kollagene Strukturen, ECM sowie unterschiedliche Zellen bei beiden Sterilisationsverfahren.

Diese Studie zeigt, dass beide Sterilisationsverfahren – PES und Tutobone® - eine proinflammatorische Reaktion hervorrufen, die jedoch als kontrolliert und nicht überschießend bezeichnet werden kann.

Zusätzlich kommt es zur Zellproliferation und -differenzierung. Welches Verfahren nun die bessere Alternative darstellt, lässt sich mit diesen Ergebnissen jedoch nicht beantworten. Beide weisen ähnliche Ergebnisse auf. In zukünftigen Studien könnten durch Tierversuche oder retrospektive Studien an Patienten eventuell genauere Aussagen getroffen werden.

Zusammenfassend stellen xenogene Transplantate eine Alternative zu humanen dar.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AP = Alkalische Phosphatase

BMP = bone morphogenetic protein

CFU-GM = Colony-forming unit granulocyte macrophage

COX = Cyclooxygenase

CT = Computertomographie

ECM = Extrazelluläre Matrix

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPO = Erythropoetin

FGF = Fibroblast Growth Factor

FKS = fetales Kälberserum

GM-CSF = Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HAV = Hepatitis-A-Virus

HCV = Hepatitis-C-Virus

IL = Interleukin

IMDM = Iscove's Modified Dulbecco's Media

IFN = Interferon

LDH = Laktatdehydrogenase

LPS = Lipopolysaccharide

M-CSF = Macrophage colony-stimulating factor

MHC = Major Histocompatibility Complex

MRT = Magnetresonanztomographie

PDGF = Platelet-derived growth factor

PES = Peressigsäure-Ethanol

RANKL = Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand

REM = Rasterelektronenmikroskop

TEP = Totalendoprothese

TGF = Transforming Growth Factor

TNF = Tumor-Nekrose-Faktor

VEGF = Platelet-derived growth factor

## 7 Literatur

Aizawa, Kon, Einhorn and Gerstenfeld (2001). "Induction of Apoptosis in Chondrocytes by Tumor Necrosis Factor." *Journal of Orthopaedic Research* 19: 785-796.

Akira, Taga and Kishimoto (1993). "Interleukin-6 in Biology and Medicine." *Advances in Immunology* 54: 1-78.

Akkus and Rimnac (2006). "Fracture Resistance of Gamma Radiation Sterilized Cortical Bone." *Journal of Orthopaedic Research* 19: 927-34.

Albrektsson and Johansson (2001). "Osteoinduction, Osteoconduction and Osseointegration." *European spine journal : official publication of the European* 10 Suppl 2: S96-101.

Anderson, Keyak and Skinner (1992). "Compressive Mechanical Properties of Human Cancellous Bone after Gamma Irradiation." *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*. 74: 747-52.

Balto, Sasaki and Stashenko (2001). "Interleukin-6 Deficiency Increases Inflammatory Bone Destruction." *Infection and Immunity* 69: 744-50.

Berns, Hofmann and Gotzen (2001). "Festigkeitsuntersuchungen an Pins Aus Humaner Femurkortikalis." *Der Unfallchirurg* 104: 64-8.

Bolander (1992). "Regulation of Fracture Repair by Growth Factors." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 200: 165-70.

Boyce, Edwards and Scarborough (1999). "Allograft Bone. The Influence of Processing on Safety and Performance." *The Orthopedic clinics of North America* 30: 571-81.

Bundesärztekammer (2001). "Richtlinien Zum Führen Einer Knochenbank."  
Deutsches Ärzteblatt 98: A-1011.

Centers for Disease Control (1981). "Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles."  
MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report 30: 250-2.

Centers for Disease Control (1988). "Transmission of Hiv through Bone  
Transplantation: Case Report and Public Health Recommendations "  
MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report 37: 597-9.

Chakkalakal, Mashoof, Novak, Strates and McGuire (1994). "Mineralization and  
Ph Relationships in Healing Skeletal Defects." Journal of Biomedical  
Materials Research 28: 1439-43.

Conto. (1994). "Determination of the Clearance Factor of Unconventional Slow  
Viruses During the Processing of Dura Mater." On file at Tutogen  
Medical, Inc.

De Long, Einhorn, Koval, McKee, Smith, Sanders and Watson (2007). "Bone  
Grafts and Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. A  
Critical Analysis." The Journal of Bone and Joint Surgery 89: 649-58.

Debrunner (2000). Orthopädie. Orthopädische Chirurgie. Die Störungen Des  
Bewegungsapparates in Klinik Und Praxis Huber Hans

Dinareello (2000). "Proinflammatory Cytokines." Chest 118: 503-8.

Dougall, Glaccum, Charrier, Rohrbach, Brasel and De Smedt (1999). "Rank Is  
Essential for Osteoclast and Lymph Node Development." Genes &  
Development 13: 2412-24.

Eggen and Nordbø (1992). "Transmission of Hcv by Organ Transplantation."  
The New England Journal of Medicine 326: 411; author reply 412-3.

- Einhorn (1998). "The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing." *Clinical Orthopaedics and Related Research*: S7-21.
- Einhorn, Majeska, Rush, Levine and Horowitz (1995). "The Expression of Cytokine Activity by Fracture Callus." *Journal of Bone and Mineral Research* 10: 1272-81.
- Europäisches Parlament und Rat (2005). Richtlinie 2004/23/Eg Des Europäischen Parlamentes Und Des Rates Vom 31.03.2004 Zur Festlegung Von Qualitäts- Und Sicherheitsstandards Für Die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung Und Verteilung Von Menschlichen Geweben Und Zellen. *Official Journal of the European Union*. L102/58.
- Fattori, Cappelletti, Costa, Sellitto, Cantoni and Carelli (1994). "Defective Inflammatory Response in Interleukin 6-Deficient Mice." *The Journal of Experimental Medicine* 180: 1243-50.
- Feghali and Wright (1997). "Cytokines in Acute and Chronic Inflammation." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 2: d12-26.
- Ferrara and Davis-Smyth (1997). "The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor." *Endocrine Reviews* 18: 4-25.
- Franzoso, Carlson, Xing, Poljak, Shores and Brown (1997). "Requirement for Nf-Kappa-B in Osteoclast and B-Cell Development." *Genes & Development* 11: 3482-96.
- Friedlaender (1983). "Immune Responses to Osteochondral Allografts. Current Knowledge and Future Directions." *Clinical Orthopaedics and Related Research*: 58-68.



- Friedman (1990). "Osteoradionecrosis: Causes and Prevention." NCI monographs : A Publication of the National Cancer Institute: 145-9.
- Galea and Kearney (2005). "Clinical Effectiveness of Processed and Unprocessed Bone." Transfusion medicine (Oxford, England) 15: 165-74.
- Gambini, Mastantuono, Di Giorgio, Valeo and Bassetti (1999). "Rehabitation of Allograft with Bone Dehydrated with Solvents In." La Chirurgia Degli Organi di Movimento 84: 359-66.
- Gao, Grassi, Ryan, Terauchi, Page, Yang and Weitzmann (2007). "Ifn-Gamma Stimulates Osteoclast Formation and Bone Loss in Vivo Via Antigen-Driven T Cell Activation." The Journal of Clinical Investigation 117: 122-32.
- Goldring (2000). "The Final Pathogenetic Steps in Focal Bone Erosions in Rheumatoid Arthritis." Annals of the Rheumatic Diseases 59 Suppl 1: i72-4.
- Goulet, Senunas, DeSilva and Greenfield (1997). "Autogenous Iliac Crest Bone Graft. Complications and Functional Assessment." Clinical Orthopaedics and Related Research: 76-81.
- Griss, Orth, Wilke and Franke (1993). "Established Aspects and Current Knowledge in Biomaterials Research." Zeitschrift für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete 131: 488-95.
- Gunther, Scharf, Pesch and Puhl (1998). "Integration Properties of Bone Substitute Materials. Experimental Studies on Animals." Der Orthopäde 27: 105-17.
- Harris (1995). "The Problem Is Osteolysis." Clinical Orthopaedics and Related Research: 46-53.

Hartung (2002). Statistik: Lehr- Und Handbuch Der Angewandten Statistik. Wien, Oldenbourg Verlag - München.

Haynert (1990). "Application Possibilities of Human Bone-Collagen Substance as a Transplant in Skeletal Surgery." Beiträge zur Orthopädie und Traumatologie 37: 453-61.

Hofbauer (1999). "Osteoprotegerin Ligand and Osteoprotegerin: Novel Implications for Osteoclast Biology and Bone Metabolism." European Journal of Endocrinology 141: 195-210.

Hofbauer, Lacey, Dunstan, Spelsberg, Riggs and Khosla (1999). "Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-Alpha, but Not Interleukin-6, Stimulate Osteoprotegerin Ligand Gene Expression in Human Osteoblastic Cells " Bone 25: 255-9.

Hofmann, Hofmann and Gotzen (2000). "Effect of Various Bone Disinfection and Sterilization Methods on Osteoblast Function. A Comparative in Vitro Study." Der Unfallchirurg 103: 380-8.

Jäger, Westhoff, Wild and Krauspe (2005). "Knochenspanentnahme Am Becken. Techniken Und Probleme." Der Orthopäde 34: 976-82, 984, 986-90, 992-4.

Jensen, Hunt, Scheuenstuhl and Banda (1986). "Effect of Lactate, Pyruvate, and Ph on Secretion of Angiogenesis and Mitogenesis Factors by Macrophages." Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology 54: 574-8.

Kalla, Hintz-Obertreis, Wilke, Griss, Seiler, Rude and Krumwieh (1991). "Bone Marrow Obtained During Hip Surgery: A Novel Source for Studies of Hemopoiesis in Human Long-Term Bone Marrow Culture (Ltbmc)." Behring Institute Mitteilungen: 93-8.

- Kawashima and Stashenko (1999). "Expression of Bone-Resorptive and Regulatory Cytokines in Murine Periapical Inflammation." *Archives of Oral Biology* 44: 55-66.
- Kaysinger and Ramp (1998). "Extracellular Ph Modulates the Activity of Cultured Human Osteoblasts." *Journal of Cellular Biochemistry* 68: 83-9.
- Kitazawa, Kimble, Vannice, Kung and Pacifici (1994). "Interleukin-1 Receptor Antagonist and Tumor Necrosis Factor Binding Protein Decrease Osteoclast Formation and Bone Resorption in Ovariectomized Mice." *The Journal of clinical investigation* 94 2397-406.
- Kitazawa, Kitazawa and Maeda (1999). "Promoter Structure of Mouse Rankl/Trance/Opgl/Odf Gene." *Biochimica et Biophysica Acta* 1445: 134-41.
- Kline and Hull (1960). "The Virucidal Properties of Peracetic Acid." *American Journal of Clinical Pathology* 33: 30-3.
- Kobayashi, Kadono, Naito, Matsumoto, Yamamoto and Tanaka (2001). "Segregation of Traf6-Mediated Signaling Pathways Clarifies Its Role in Osteoclastogenesis." *The EMBO Journal* 20: 1271-80.
- Koch, Sprossig and Mucke (1967). "On the Antimicrobial Effect of Peracetic Acid. 4. Studies on the Fungicidal Effect." *Pharmazie* 22: 520-1.
- Kodama, Yamasaki, Nose, Niida, Ohgame, Abe and Kumegawa (1991). "Congenital Osteoclast Deficiency in Osteopetrotic (Op/Op) Mice Is." *Journal of Experimental Medicine* 173: 269-72.
- Kohno, Kataoka, Ohtsuki, Suemoto, Okamoto, Usui and Ikeda (1997). "Ifn-Gamma-Inducing Factor (Igif) Is a Costimulatory Factor on the Activation

- of Th1 but Not Th2 Cells and Exerts Its Effect Independently of Il-12." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 158: 1541-50.
- Kon, Cho, Aizawa, Yamazaki, Nooh, Graves, Gerstenfeld and Einhorn (2001). "Expression of Osteoprotegerin, Receptor Activator of Nf-KappaB Ligand (Osteoprotegerin Ligand) and Related Proinflammatory Cytokines During Fracture Healing." Journal of Bone and Mineral Research 16: 1004-14.
- Krieger, Sessler and Bushinsky (1992). "Acidosis Inhibits Osteoblastic and Stimulates Osteoclastic Activity." The American Journal of Physiology 262: F442-8.
- Kudo, Fujikawa, Itonaga, Sabokbar, Torisu and Athanasou (2002). "Proinflammatory Cytokine (Tnf-Alpha/Il-1alpha) Induction of Human Osteoclast Formation." The Journal of Pathology 198: 220-7.
- Kuhls, Werner-Rustner, K  chler and Soost (2001). "Human Demineralised Bone Matrix as a Bone Substitute for Reconstruction of Cystic Defects of the Lower Jaw " Cell and Tissue Banking 2: 143-53.
- Kurihara, Bertolini, Suda, Akiyama and Roodman (1990). "Il-6 Stimulates Osteoclast-Like Multinucleated Cell Formation in Long Term Human Marrow Cultures by Inducing Il-1 Release." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 144: 4226-30.
- Lacey, Timms, Tan, Kelley, Dunstan, Burgess and Elliott (1998). "Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine That Regulates Osteoclast Differentiation and Activation." Cell Press 93: 165-76.
- Lam, Takeshita, Barker, Kanagawa, Ross and Teitelbaum (2000). "Tnf-Alpha Induces Osteoclastogenesis by Direct Stimulation of Macrophages Exposed to Permissive Levels of Rank Ligand." The Journal of Clinical Investigation 106: 1481-8.

- Lee and Lorenzo (1999). "Parathyroid Hormone Stimulates Trance and Inhibits Osteoprotegerin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Murine Bone Marrow Cultures: Correlation with Osteoclast-Like Cell Formation." *Endocrinology* 140: 3552-61.
- Mejdahl, Hansen, Skjodt and Reimann (1998). "Human Bone Bank Allografts Stimulate Bone Resorption and Inhibit Proliferation in Cultures of Human Osteoblast-Like Cells." *Acta Orthopaedica Scandinavica* 69: 63-8.
- Merkel, Erdmann, McHugh, Abu-Amer, Ross and Teitelbaum (1999). "Tumor Necrosis Factor-Alpha Mediates Orthopedic Implant Osteolysis." *The American Journal of Pathology* 154: 203-10.
- Meyer, Floerkemeier and Windhagen (2008). "Histological Osseointegration of Tutobone: First Results in Human." *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 128: 539-44.
- Munting, Wilmar, Wijne, Hennebert and Delloye (1988). "Effect of Sterilization on Osteoinduction. Comparison of Five Methods in Demineralized Rat Bone." *Acta orthopaedica Scandinavica* 59: 34-8.
- Okamura, Kashiwamura, Tsutsui, Yoshimoto and Nakanishi (1998). "Regulation of Interferon-Gamma Production by Il-12 and Il-18." *Current Opinion in Immunology* 10: 259-64.
- Owen, Aronow, Shalhoub, Barone, Wilming and Tassinari (1990). "Progressive Development of the Rat Osteoblast Phenotype in Vitro: Reciprocal Relationships in Expression of Genes Associated with Osteoblast Proliferation and Differentiation During Formation of the Bone Extracellular Matrix." *Journal of Cellular Physiology* 143: 420-30.
- Papula (2001). *Mathematik Für Ingenieure Und Naturwissenschaftler-Band 3*, Vieweg Verlag.

- Pellat, Henry and Drapier (1990). "Ifn-Gamma-Activated Macrophages: Detection by Electron Paramagnetic Resonance of Complexes between L-Arginine-Derived Nitric Oxide and Non-Heme Iron Proteins." Biochemical and biophysical research communications 166: 119-25.
- Pruss, Baumann, Seibold, Kao, Tintelnot and von Versen (2001). "Validation of the Sterilization Procedure of Allogeneic Avital Bone Bone Transplants Using Peracetic Acid–Ethanol " Biologicals 29: 59-66.
- Pruss, Kao, Kiesewetter, von Versen and Pauli (1999). "Virus Safety of Avital Bone Tissue Transplants: Evaluation of of Sterilization Steps of Spongiosa Cuboids Using a Peracetic Acid–Methanol Mixture " Biologicals 27: 195-201.
- Pruss, Perka, Degenhardt, Maronna, Büttner-Janz and Paul (2002). "Clinical Efficacy and Compatibility of Allogeneic Avital Tissue Transplants Sterilized with a Peracetic Acid/Ethanol Mixture " Cell and Tissue Banking 3: 235-43.
- Reddi (1998). "Role of Morphogenetic Proteins in Skeletal Tissue Engineering And." Nature biotechnology 16: 247-52.
- Redlich, Hayer, Ricci, David, Tohidast-Akrad and Kollias (2002). "Osteoclasts Are Essential for Tnf-Alpha-Mediated Joint Destruction." The Journal of Clinical Investigation 110: 1419-27.
- Roodman (1999). "Cell Biology of the Osteoclast." Experimental Hematology 27: 1229-41.
- Rössler Rüter Steinhagen (2005). Orthopädie Und Unfallchirurgie, Elsevier.

- Runde (2005). Grundlagen Der Induktiven Statistik, Lehrstuhl für Statistik und Ökonometrie, Fachbereich Wirtschaftswissenschaften, Universität Siegen.
- Sakata, Shiba, Komatsuzawa, Fujita, Ohta and Sugai (1999). "Expression of Osteoprotegerin (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor) in Cultures of Human Dental Mesenchymal Cells and Epithelial Cells." *Journal of Bone and Mineral Research* 14: 1486-92.
- Sasaki, Balto, Kawashima, Eastcott, Hoshino and Akira (2004). "Gamma Interferon (Ifn-Gamma) and Ifn-Gamma-Inducing Cytokines Interleukin-12 (Il-12) and Il-18 Do Not Augment Infection-Stimulated Bone Resorption in Vivo." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11: 106-10.
- Simonds, Holmberg, Hurwitz, Coleman and Bottenfield (1992). "Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Patient Who Developed Aids to an Elite Suppressor." *The New England Journal of Medicine* 326: 726-32.
- Spector, Mehrara, Greenwald, Saadeh and Steinbrech (2001). "Osteoblast Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Is Modulated by the Extracellular Microenvironment." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 280: C72-80.
- Sporkenbach, Wiegers and Dernick (1981). "Die Virusinaktivierende Wirkung Von Persäuren Und Persauren Desinfektionsmitteln." *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 1 173: 425-39.
- Sproessig and Muecke (1965). "Increase in the Virus-Activating Effect of Peracetic Acid by N-Propyl Alcohol." *Acta Biologica et Medica Germanica* 14: 199-200.

Sprössig (1979). Anwendungsmöglichkeiten Der Peressigsäure Für Desinfektion Und Sterilisation.

Srivastava, Toraldo, Weitzmann, Cenci, Ross and Pacifici (2001). "Estrogen Decreases Osteoclast Formation by Down-Regulating Receptor Activator of Nf-Kappa B Ligand (Rankl)-Induced Jnk Activation." The Journal of Biological Chemistry 276: 8836-40.

Stashenko, Dewhirst, Peros, Kent and Ago (1987). "Synergistic Interactions between Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor, and Lymphotoxin in Bone Resorption." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 138: 1464-8.

Steinbrech, Mehrara, Saadeh, Greenwald and Spector (2000). "Vegf Expression in an Osteoblast-Like Cell Line Is Regulated by a Hypoxia Response Mechanism " American Journal of Physiology. Cell Physiology 278: C853-60.

Swenson O and Clasff CL (1946). "Changes in the Hydrogen Ion Concebration of Healing Fractures." Proc Soc Exp Biol Med 61: 151-154.

Takayanagi, Kim, Koga, Nishina, Isshiki, Yoshida and Saiura (2002). "Induction and Activation of the Transcription Factor Nfatc1 (Nfat2) Integrate Rankl Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts." Developmental Cell 3: 889-901.

Takayanagi, Ogasawara, Hida, Chiba, Murata and Sato (2000). "T-Cell-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis by Signalling Cross-Talk between Rankl and Ifn-Gamma." Nature 408: 600-5.

Thielicke, Thielicke, von Versen and Denner (1990). "Klinische Studie Zum Einsatz Von Demineralisierter Knochenmatrix (Dbm) in Der Chirurgischen Stomatologie." Beiträge zur Orthopädie und Traumatologie 37: 461-5.



- Tilg, Trehu, Atkins, Dinarello and Mier (1994). "Interleukin-6 (Il-6) as an Anti-Inflammatory Cytokine: Induction of Circulating Il-1 Receptor Antagonist and Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor P55." *Blood* 83: 113-8.
- Tomford (2000). "Bone Allografts: Past, Present and Future." *Cell and Tissue Banking* 1: 105-9.
- Trentz, Hoerstrup, Sun, Bestmann, Platz and Trentz (2003). "Osteoblasts Response to Allogenic and Xenogenic Solvent Dehydrated Cancellous Bone in Vitro " *Biomaterials* 24: 3417-26.
- Tutogen. "Informationsmaterial Der Firma Tutogen."
- Uchida, Nade, McCartney and Ching (1987). "Growth of Bone Marrow Cells on Porous Ceramics in Vitro." *Journal of Biomedical Materials Research* 21: 1-10.
- Universität Saarland. from <http://psydok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2004/268/html/surfstat/t.htm>.
- Urist, Silverman, Büring, Dubuc and Rosenberg (1967). "The Bone Induction Principle." *Clinical orthopaedics and related research* 53: 243-83.
- van de Loo, Kuiper, van Enckevort, Arntz and van den Berg (1997). "Interleukin-6 Reduces Cartilage Destruction During Experimental Arthritis. A Study in Interleukin-6-Deficient Mice." *The American Journal of Pathology* 151: 177-91.
- van den Berg (1999). "The Role of Cytokines and Growth Factors in Cartilage Destruction in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis." *Zeitschrift für Rheumatologie* 58: 136-41.

- Van Snick (1990). "Interleukin-6: An Overview." Annual Review of Immunology 8: 253-78.
- Vilmar and Bachmann (1996). "Bekanntmachungen: Wissenschaftlicher Beirat Der Bundesärztekammer - Richtlinien Zum Führen Einer Knochenbank." Deutsches Aerzteblatt 93: A-2166.
- von Garrel and Gotzen (1998). "Allogene Knochentransplantation Und Knochenbanking." Der Unfallchirurg 101: 713-27.
- Wallach, Varfolomeev, Malinin, Goltsev and Kovalenko (1999). "Tumor Necrosis Factor Receptor and Fas Signaling Mechanisms." Annual Review of Immunology 17: 331-67.
- Werner and Wewalka (1973). "Abtötung Von Sporen in Alkohol Durch Peressigsäure." Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde 157: 387-91.
- Whyte (1994). "Hypophosphatasia and the Role of Alkaline Phosphatase in Skeletal Mineralization." Endocrine Reviews 15: 439-61.
- Wilke (1995). "Cell Differentiation of Human Bone Marrow Cells Depending on Applied Biomaterials." Techn. Srl., Faenza, Italy: 343-348.
- Wilke, Orth, Lomb, Fuhrmann, Kienapfel, Griss and Franke (1998). "Biocompatibility Analysis of Different Biomaterials in Human Bone Marrow Cell Cultures." Journal of Biomedical Materials Research 40: 301-6.
- Wilke, Schroder, Orth, Griss and Franke (1993). "Evaluation of the Biocompatibility of Implant Materials with Human Bone Marrow Cell Cultures." Biomedizinische Technik 38: 126-9.

Wilke, von Hirschheydt, Orth, Kienapfel, Griss and Franke (1995). "Human Bone Marrow Cell Culture - a Sensitive Method for the Evaluation of the Biocompatibility of Materials Used in Orthopedics." Zeitschrift für Orthopädie und Ihre Grenzgebiete 133: 159-65.

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU	16
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES 1ER WELL MIT KNOCHENPLÄTTCHEN	16
ABBILDUNG 3: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER ANZAHL AN VITALEN ZELLEN	26
ABBILDUNG 4: NEUBAUER-ZÄHLKAMMER NACH TRYPANBLAUFÄRBUNG	32
ABBILDUNG 5: ZELLEN IN DER ERSTEN WOCHE NACH VERSUCHSBEGINN	36
ABBILDUNG 6: WELLBODEN MIT PES-STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN - 8 WOCHEN NACH VERSUCHSBEGINN	36
ABBILDUNG 7: KNOCHENPLÄTTCHEN, PES-VERFAHREN - 12 WOCHEN NACH VERSUCHSBEGINN	37
ABBILDUNG 8: KNOCHEN, PES-VERFAHREN - 12 WOCHEN NACH VERSUCHSBEGINN	39
ABBILDUNG 9: KNOCHEN, 0-PROBE, PES-VERFAHREN	40
ABBILDUNG 10: TUTOPLAST®-VERFAHREN - 12 WOCHEN NACH VERSUCHSBEGINN	41
ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER PH – WERTE VON MEDIUM, ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	42
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DER IL -6-AUSSCHÜTTUNG IN PG/DL VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	45
ABBILDUNG 13: VERGLEICH DER TNF-A- AUSSCHÜTTUNG IN PG/ML VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	49
ABBILDUNG 14: VERGLEICH DER IL-1B- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	53
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER IFN- $\gamma$ - AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	57
ABBILDUNG 16: VERGLEICH DER LDH- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	61
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER AP-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	65

---

ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER LAKTAT-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN	69
ABBILDUNG 19 : GIEMSA-FÄRBUNG NACH 12 WOCHEN; PES-VERFAHREN; WELL- BODEN	76
ABBILDUNG 20: GIEMSA-FÄRBUNG NACH 12 WOCHEN; PES-VERFAHREN; KNOCHENTRABEKEL	77
ABBILDUNG 21: TUTOPLAST®-VERFAHREN – 100 FACHE VERGRÖßERUNG	80
ABBILDUNG 22: TUTOPLAST®-VERFAHREN - 400-FACHE VERGRÖßERUNG	80
ABBILDUNG 23: PES-VERFAHREN – 100-FACHE VERGRÖßERUNG	94

## 8.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: WERTETABELLE STUDENTS-T-TEST .....	33
TABELLE 2: VERGLEICH DER IL -6-AUSSCHÜTTUNG IN PG/DL VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 1-28 ...	46
TABELLE 3: VERGLEICH DER IL -6-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, PES UND TUTOPLAST® – TAG 29 – 84 .....	47
TABELLE 4: VERGLEICH DER TNF-A- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 1 – 28.....	50
TABELLE 5: VERGLEICH DER TNF-A- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 29 – 84.....	51
TABELLE 6: VERGLEICH DER IL-1B- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 1 BIS 28 .....	54
TABELLE 7: VERGLEICH DER IL-1B- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 29 BIS 84 .....	55
TABELLE 8: VERGLEICH DER IFN- $\gamma$ - AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 1 – 28.....	58
TABELLE 9: VERGLEICH DER IFN- $\gamma$ - AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 29 BIS 84 .....	59
TABELLE 10: VERGLEICH DER LDH- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN ABZÜGLICH DES LEERWERTES VON MEDIUM – TAG 1 – 28.....	62
TABELLE 11: VERGLEICH DER LDH- AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 29 – 84.....	63
TABELLE 12: VERGLEICH DER AP-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 1- 28 .....	66
TABELLE 13: VERGLEICH DER AP-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 29 - 84 .....	67
TABELLE 14: VERGLEICH DER LAKTAT-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 1 – 28.....	70

---

TABELLE 15: VERGLEICH DER LAKTAT-AUSSCHÜTTUNG VON ZELLEN, TUTOPLAST®- UND PES- STERILISIERTEN KNOCHENPLÄTTCHEN – TAG 29 - 84.....	71
--	----

## 9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Allogene und Xenogene Knochentransplantate – Induktion einer  
proinflammatorischen Reaktion in vitro?“

im Institut für experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. David Jones ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden publiziert in:

Zeitung für Orthopädie und ihre Grenzgebiete. 2005 Nov-Dec;  
143(6):660-8.

Poster DGU/DGOOC Kongress 2005



## 10 Anhang

### 10.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

#### 10.1.1 Geräte

+4°C Kühlschrank – Liebherr, Ochsenhausen

-20°C Kühlgerät – Liebherr, Ochsenhausen

-80°C Hera freeze, HFU 586 basic, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau

Analysegerät Hitachi 917 – Roche, Mannheim

Autoklav 3850 EL – Tuttnauer, NY, USA

Bandelin Sonorex TK 52 – Bandelin Electronic, Berlin

Biofuge 13 – Heraeus Instruments, Hanau

Bohrer PF 360 – Proxxon GmbH, Niersbach

Brutschrank BB-16 CU, Heraeus Instruments, Hanau

Bunsenbrenner – Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Casy® 1 TTC, Version SCI TTC (Zellzähler) – Schärfe System GmbH, Reutlingen

Critical Point Kammer – Balzers, Liechtenstein

Diamant Trennband D64 0,2 mm – DIA-Plus Walter Messner GmbH, Oststeinbeck

Digital-pH-Meter 646 – Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co.KG, Berlin

Durchlichtmikroskop DM IL Fluo – Leica, Wetzlar

Eppendorf Multipipette®plus – Eppendorf AG, Hamburg

EXAKT-Trennschleifsystem – EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt

Feinwaage I 1801 – Sartorius GmbH, Göttingen

Heizplatte mit Magnetrührer MR 2002 – Heidolph, Gießen

Hitzeschrank, SUT 6200 Heraeus, Hanau

Laborfuge 400R – Heraeus Instruments, Hanau

Mikrotom Polycut E – Reichert-Jung

Neubauer-Zählkammer – Schreck, Hofheim

Pipetman® P 20, P 200, P 1000 – Gilson Inc., Middleton, USA

Pipetmann® Ultra Multichannel 8x300 – Gilson Inc., Middleton, USA

Pipetus®-akku – Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt

Rasterelektronenmikroskop ISI SX 30 – ISI, GB

Schüttler Swip KS-10 – Edmund Bühler GmbH, Hechingen

Sputter Coater S150 – Edwards, West Sussex, GB

Tirtek Multiskan® MC – Flow Laboratories GmbH, Meckenheim

Vertikal Laminar Flow Gerät UV 1800 – Uniflow

Vortex: REAX 2000 – Heidolph, Kehlheim

### 10.1.2 Verbrauchsmaterialien

0,2% Liquemin – Hoffmann-La Roche

Accutase - PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU

Aceton - Merck, Darmstadt

Alkalische Phosphatase IFCC liquid Reagenz – Roche, Mannheim

Amphotericin B - Sigma Diagnostics, St. Louis, USA

Anti-Human IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Assay Diluent - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Coating Buffer Sodium - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Human IFN- $\gamma$  ELISA Set - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Human IL-1 $\beta$  ELISA Set - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Human IL-6 ELISA Set - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Human TNF ELISA Set - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Substrate Reagent A - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Substrate Reagent B - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

BD-OptEIA™ Wash Concentrate (20x) - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

Biocoll Separating Solution, 1,077 – Biochrom AG, Berlin

Biotinylated Anti Human IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

Capture Antibody – BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA

Casy cups – Schärfe, Reutlingen  
Casy-ton – Schärfe, Reutlingen  
Cellstar Gewebekulturschalen 35 / 10 mm – Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen  
Cellstar®-Pipetten 10 ml – Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen  
Certomycin® - Essex Pharma, München  
Deckgläser rund, Durchmesser 2 cm - Menzel-Gläser, Braunschweig  
Detection Antibody - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA  
Earle`s Salt Solution – Biochrom AG, Berlin  
Entellan – Merck, Darmstadt  
Enzym Reagent - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA  
Eppendorf Biopur® Combitips plus 5ml und 25 ml- Eppendorf AG, Hamburg  
Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml und 2 ml – Eppendorf AG, Hamburg  
Eppendorf Safe-Lock.Tubes 2,0 ml – Eppendorf AG, Hamburg  
Ethanol - Merck, Darmstadt  
Falcon® Bottle Top Filter 150 ml (0,45µm, 0,22µm) – Becton-Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA  
Falcon®-Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml – Becton-Dickenson Labware, Franklin Lake, USA  
Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert - PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU  
Formaldehydlösung 37% - Merck, Darmstadt  
Gentamicin - Sigma Diagnostics, St. Louis, USA  
Giemsa Lösung – Merck, Darmstadt  
Glutaraldehydlösung – Merck, Darmstadt  
Granulocyte-macrophage-colony-stimulation-factor, human - Calbiochem® Merck, Darmstadt  
Histopaque®, 1,119 – Sigma Diagnostics, St. Louis, USA  
Hydrocortison - Sigma Diagnostics, St. Louis, USA  
Interleukin-3 Human Recombinant - Calbiochem® Merck, Darmstadt  
Iscoe`s modified Dulbeccos medium (IMDM) Pulver – Gibco, Karlsruhe  
Kupfer-(III)-Sulfat-Pentahydrat – Carl Roth GmbH &Co, Karlsruhe

Lactate Reagenz – Roche, Mannheim  
L-Glutamin - Biochrom AG, Berlin  
Methanol – Riedel-de Haën AG, Seelze  
Millex®-GS Spritzenaufsatzfilter 0,22µm – Millipore Corporation, Bedford, USA  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Merck, Darmstadt  
NaCl - Merck, Darmstadt  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Merck, Darmstadt  
NaHCO<sub>3</sub> – Merck, Darmstadt  
NaOH - Merck, Darmstadt  
Natrium Cacodylat – SERVA, Heidelberg  
Nunc-Immuno Platten MaxiSorp F96 – Nunc & Co.KG, Wiesbaden  
Objektträger Super Frost® Plus – Menzel-Gläser, Braunschweig  
Osmiumtetroxid – Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe  
Paraformaldehydpulver - Merck, Darmstadt  
Pasteur Pipetten – Hirschmann®-Laborgeräte, Eberstadt  
PBS-Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> - Biochrom AG, Berlin  
Penicillin mit Streptomycin – PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU  
Pferdeserum, hitzeinaktiviert – PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU  
Pipettenspitzen 200 µl und 1000µl - Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen  
Polyethylenfolie – Heraeus Kulzer, Hanau  
Poly-L-Lysine Solution 0,1,% w/v in water – Sigmy-Aldrich Co, St. Louis, USA  
Standards Recombinant Human IFN-γ 75 ng/vial - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA  
Standards Recombinant Human IL-1β 100 ng/vial - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA  
Standards Recombinant Human IL-6 120 ng/vial - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA  
Standards Recombinant Human TNF-α 110 ng/vial - BD Bioscience Pharmigen, San Diego, USA  
Technovit 9100 Neu – Heraeus Kulzer, Hanau  
Tissue-Tek Uni-Cassets – Miles, Naperville, Irland

---

Trypsin-EDTA Solution - Sigma Diagnostics, St. Louis, USA

Unolok, sterile Spritzen, 50 ml – HMD Healthcare Limited, West Sussex, GB

Xylol – Merck, Darmstadt

## 10.2 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

in Marburg:

Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Baumann, Burghard, Celik,  
Christiansen, Czubayko, Daut, Engelhardt-Cabillic, Feuser, v. Garrel, Gerdes,  
Görg, Gotzen, Griss, Gudermann, Hellwig, Hesse, Hofmann, Jungclas, Junge,  
Kienapfel, Klose, Koolmann, Kretschmer, Kroll, Kuhlmann, Lemke, Lengsfeld,  
Lill, Löw, Maier, Maisch, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz,  
Richter, Röhm, Rothmund, Schädel-Höpfner, Schmidt, Schnabel, Schneyer,  
Seitz, Seybert, Steininger, Stiletto, Stinner, Vogelmeier, Weihe, Werner, Wilke,  
Wirth, Zielke

in Siegen

Burghard, Gehrke

In Crans-Montana, Schweiz

Eberhard, Vaney

## 10.3 Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Geburtsdatum/-ort:** 13.09.1980 / Gießen  
**Eltern:** Vater: Udo Reichel, Dipl. Elektroingenieur  
Mutter : Kornelia Reichel, geb. Lorenz, Erzieherin  
**Familienstand:** ledig

### Schul Ausbildung

1987 - 1991 Grunds Schulbesuch in der Mittelpunktschule Dautphetal  
1991 – 2000 Lahntalschule Biedenkopf

### Hochschulausbildung

2000 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg  
10/2006 Approbation als Ärztin

### Praktisches Jahr

Innere Medizin: Bernerlinik in Crans-Montana, Schweiz  
Chirurgie: Kreiskrankenhaus Siegen, Kinderchirurgie der DRK-Kinderklinik in Siegen  
Pädiatrie: DRK-Kinderklinik in Siegen

### Berufliche Weiterbildung

Seit 10/2006: Pädiatrie an der DRK-Kinderklinik in Siegen



## 11 Danksagung

Diese Arbeit wurde von Oktober 2003 bis Oktober 2005 im Labor für experimentelle Orthopädie der Philipps – Universität Marburg angefertigt.

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich beim Anfertigen der Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Axel Wilke für seine Betreuung und die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Stefan Endres für seine Unterstützung und Geduld bei der Anfertigung der Dissertation.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Marita Kratz, MTA im Labor für experimentelle Orthopädie, die mir über die gesamte Zeit mit Rat und Tat zu Seite gestanden hat.

Ein weiterer Dank gilt dem Labor für experimentelle Orthopädie mit seinem Direktor Prof. Dr. David Jones.

Danken möchte ich auch Simon Martin Heinz und Christoph Herzberger für ihre tatkräftige Unterstützung und Denkanstöße bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinem Freund, Florian Trenker, der in dieser Zeit immer für mich da war und mir zur Seite stand.

Vielen Dank meinen Eltern und meiner Schwester, die mich motiviert haben, diese Arbeit zu vollenden.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Freundin Dr. Sonja Dorothea Barth, die mich bei dieser Arbeit unterstützt hat